Immunologische Untersuchungen zur Korrelation zwischen Rheumafaktor-Aktivität und Serumgehalt an β_2– und α_2– Makroglobulinen bei Rheumatikern

von

ERNST DIETRICH BARON von MIRBACH

München 1965

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR KORRELATION ZWISCHEN RHEUMAFAKTOR-AKTIVITÄT UND SERUMGEHALT AN β_2- UND α_2-MAKROGLOBULINEN BEI RHEUMATIKERN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ernst Dietrich Baron v. M i r b a c h
aus
Hemmelmark
München 1965

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Referent: Privatdozent Dr. H. Mathies
Korreferent: Prof. Dr. W. Seitz
Dekan: Prof. Dr. R. Zenker
Tag der mündlichen Prüfung: 7. XII. 1965

Mikrokopie GmbH. · München 22 · Bruderstraße 9

Meinem Vater,
der mir das Studium ermöglichte.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	5
2. DYSPROTEINÄMIEN und ihre Bestimmungsmethoden	7
3. GELDIFFUSIONSMETHODEN und ihre Modifikationen	16
4. NATUR UND NACHWEISMETHODEN DES RHEUMAFAKTORS	24
5. METHODIK und eigene VERSUCHE	31
Versuchsaufbau	31
Material	36
Tabelle der untersuchten Patienten	40
Abbildungen	42
Meßergebnisse	44
Graphische Darstellung der gefundenen Werte	49
Mathematisch statistische Auswertung	55
6. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	59
7. ZUSAMMENFASSUNG	63
8. LITERATURVERZEICHNIS	64
9. LEBENSLAUF	69

EINLEITUNG

In dem Resümee des V. Europäischen Kongresses für rheumatische Krankheiten 1963 in Stockholm, welches in vielen Fachzeitschriften abgedruckt war, klang sehr stark die Meinung durch, daß trotz der zahlreichen und verschieden reagierenden Untersuchungsmethoden die Kenntnisse über das Krankheitsbild des Rheumatismus und die ihn auslösenden Faktoren doch noch nicht sehr umfassend sind. Wohl liefern uns die Laboratoriumsergebnisse immer neue wertvolle Aussagen zu diesem Mosaik, doch fehlt der Kitt, die zusammenfügende Klammer, um diese einzelnen Ergebnisse an den ihnen gebührenden Ort einzuordnen. Vielleicht ist es ein Zeichen für dieses tastende Suchen, daß immer aufs neue Modifikationen der bekannten Untersuchungsmethoden publiziert werden, wobei sich die Frage erhebt, ob wirklich alle bisherigen Nachweise der serologischen Rheumatologie voll ausgeschöpft sind, ehe man sich neuen, technisch vielfach schwierigen und in ihrem Aussagewert noch nicht abgesicherten, zuwendet.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, mit der 1947 publizierten, sehr exakten Geldiffusionsmethode nach Ouchterlony das große Krankengut der Rheumaambulanz der Universitätspoliklinik in München darauf zu prüfen, ob Zusammenhänge zwischen der Zunahme der α_2- und β_{2M}-Globuline bei Patienten mit primär chronischer Polyarthritis und dem Anstieg des Rheumafaktors, dargestellt durch die Erhöhung des Latexwertes, bestehen.

Gerade diese Methode von Ouchterlony, die ursprünglich zur Prüfung der Toxität von Diphtheriebakterien angegeben wurde, hat in den letzten Jahren eine erhebliche Verbreitung gefunden und auch die Fragestellungen, die damit geklärt werden sollten, waren unterschiedlich, wie es die Zusammenstellungen in den Bänden V und VI der Reihe "Progress in Allergy" deutlich machen. Auch in unserem Fall mußten wir die Methode variieren, um dieser Aufgabenstellung am besten gerecht zu werden.

Wir prüften in umfangreichen Vorversuchen die für unsere Untersuchung optimale Agarkonzentration, die Diffusions- und Färbedauer, welche sich nicht immer mit

den Angaben in der Literatur deckten, mußten verschiedene Stanzen ausprobieren, die uns nach langen Bemühungen in der orthopädischen Werkstätte der Poliklinik angefertigt wurden und konnten dann mit der eigentlichen Untersuchung beginnen.

Dabei gingen wir davon aus, daß eine derartige Mikromethode, wie sie die von Ouchterlony angegebene darstellt, darauf geprüft werden sollte, wie leistungsstark sie ist, welche Ergebnisse bei sorgfältigstem Arbeiten und Beachten der optimalen Versuchsbedingungen zu erlangen seien. So fanden wir, daß ein Abstand von zwei Teilstrichen einer Blutzuckerpipette zu zwei Teilen aqua bidestillata, also ein Mischungsverhältnis von 1 : 1 als Schritt in der Verdünnungsreihe die kleinste verwendbare Menge darstellen, ihre Halbierung erbrachte im Präparat keine genauere Ausbildung der Linien und damit des gesuchten Grenzwertes.

Aber wir glaubten, daß bei den zu untersuchenden Seren eine Verdünnungsreihe in so kleinen Schritten statt einer geometrischen nötig sei, um die ganze Leistungsfähigkeit dieser Mikromethode erschöpfend zu nutzen, und bei diesen Fällen von Dysproteinämie, wo schon geringe Abweichungen aufschlußreich sind, eine gesichertere Aussage machen zu können.

Daß wir diese Reihe wesentlich früher beginnen und später enden ließen, als es die zu erwartenden Werte rechtfertigten, um auf diese Weise auch ausscherende Ergebnisse einzufangen, ist nur der auch sonst geforderten Exaktheit im Arbeiten entsprechend. Durch eine statistische Berechnung glaubten wir unsere Ergebnisse noch stärker absichern zu können.

DYSPROTEINÄMIEN UND IHRE BESTIMMUNGSMETHODEN

Zur Diagnose der Dysproteinämie stehen uns verschiedene, in ihrem Aussagewert unterschiedliche Methoden zur Verfügung, deren wichtigste hier aufgeführt werden sollen.

Die Bedeutung der Blutkörperchen Senkungsreaktion (BKS), als zwar nicht spezifische, aber doch sehr aufschlußreiche Angabe bei der primär chronischen Polyarthritis (p.c.P.) ist durch das Bekanntwerden feinerer und spezifischerer Teste heute vielleicht zurückgedrängt, aber auch weiterhin nicht zu vernachlässigen.

Christ (1) hält sie bei beginnender p.c.P. und zwischen den Schüben für empfindlicher als alle anderen Nachweisreaktionen. Zwar ist eine erhöhte BKS, die eine qualitative und quantitative Veränderung der Plasmaeiweißkörper darstellt, ja nur der Ausdruck dafür, daß im Körper ein entzündliches Geschehen abläuft und eine Beschleunigung weist unter anderem auf eine Vermehrung der α_2-Globuline als dem Zeichen einer akuten Entzündung hin (111).

Sie ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig (16) und es ist eine Probe, die rasch und empfindlich reagiert und somit zur Beurteilung der Aktivität eines entzündlich rheumatischen Prozesses herangezogen werden kann, (19,28,34,63) zumal wir sie in der aktiven Phase der p.c.P. bei 90% der Fälle erhöht finden (1). Kovacs (49) jedoch meint in seiner Arbeit über die Differenzierung atypischer Fälle von chronischer Polyarthritis, daß die BKS in der Unterscheidung der primären und sekundären chronischen Polyarthritis ohne differentialdiagnostischen Wert sei (17).

Es ist auffallend, daß die Normalisierung der BKS erheblich gegenüber den sonstigen Befunden nachhängen kann, was dann dazu führt, daß erst, wenn diese sich wieder erniedrigt hat, der rheumatische Prozeß als abgeklungen gelten kann (111).

Zu den einfach ausführbaren, aber relativ empfindlichen Eiweißreaktionen gehört die 1945 von Wunderly und Wuhrmann angegebene Cadmiumsulfatreaktion (CSR) (1,6,52,63,106). Es handelt sich hierbei um eine Schwermetallfällungsreaktion, deren positiver Ausfall stets pathologisch ist und unabhängig von der BKS auf chronische oder akute Entzündungsvorgänge hinweist, der bei fieberhaften Erkrankungen

für eine α_2-, bei afebrilen Erkrankungen für eine γ-Globulin-Vermehrung spricht. Die Ausführung dieser Reaktion erfolgt so, daß dem Serum 4 Tropfen Cadmiumsulfat zugesetzt werden und das Ergebnis makroskopisch gegen ein Fensterkreuz abgelesen wird, das bei einem negativen Ausfall sichtbar bleibt. Es gibt hier eine Abstufung in der Intensität des Ausfalles, bei einer starken Reaktion jedoch setzt die Trübung sofort ein.

Für die Diagnostik ist ferner das Weltmann-Koagulationsband (WKB) geeignet (1,52,63,106), mit dessen Hilfe die Koagulationsfähigkeit von Eiweiß im Serum geprüft und damit Rückschlüsse auf pathologische Veränderungen gezogen werden können. Während Serum mit destilliertem Wasser erhitzt keine Koagulation ergibt, kommt es bei Zusatz von Calciumchlorid zu einer Flockung und diese gibt Auskunft über qualitative Serumveränderungen. Man liest dasjenige der 11 Röhrchen mit den verschiedenen Verdünnungen ab, bei dem die Bluteiweiße gerade noch flockig ausfallen, wobei jedoch eine Trübung ohne Bodensatz nicht bewertet wird.

Eine Verlängerung des Weltmannbandes, die mit einer Zunahme der γ-Globuline und einer Abnahme der Hitzekoagulierbarkeit einhergeht, wird oft zwischen der in Schüben verlaufenden p.c.P. angetroffen. Diagnostisch aufschlußreich ist die Verwertung der BKS Ergebnisse in Kombination mit denen des WKB.

Jedoch sind auch hier Fehler nicht ausgeschlossen, fand doch Tichy (1) trotz nachgewiesener γ-Globulinerhöhung in der Hälfte der Fälle von p.c.P. ein normales WKB, also die Koagulation des 6. - 7. Röhrchens.

Eine weitere Möglichkeit, die Verschiebung der Bluteiweiße, vor allem zu Gunsten der γ-Globuline zu untersuchen, zeigt die Takata-Reaktion in der Modifikation nach Mancke und Sommer (8,38). Das Serum wird mit einer physiologischen Kochsalzlösung, einer 10% Sodalösung und einer 0,25% Sublimatlösung versetzt. Der Ausfall der Flockungsreihe kann als unspezifische Eiweißlabilitätsprobe im Zusammenhang mit anderen Proben, z.B. dem Weltmannband, eine wertvolle diagnostische Hilfe darstellen, wenn auch alle diese angeführten Nachweise im Vergleich zu der viel spezifischeren Elektrophorese oder gar der Immunelektrophorese nur den Charakter von Suchreaktionen haben (48), die eine auf jene Weise gefundene Diagnose erhärten helfen.

Ein weiterer unspezifischer, aber im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen wichtiger Nachweis ist der für das C-reaktive Protein (CRP) oder akute phase protein. Es gewinnt zunehmend an diagnostischer Bedeutung, wie die im Jahre 1963 von G. Schwarz herausgegebene Monographie ausweist (91).

Nach Tillet und Francis, die es 1930 entdeckten, handelt es sich hierbei um ein besonderes Protein, das bei 70°C inaktiviert wird und mit dem C-Polysaccharid des Pneumokokkus ein Präzipitat bildet (38,40). Diese Reaktion ist für die Rheumadiagnostik unspezifisch, und Taubner (97) gibt sogar 20% Versager an, doch gewinnt man so mit diesem, ähnlich wie die BKS, schnell reagierenden Nachweis eine Vorstellung, wie akut der Prozeß verläuft (17,28,38).

Bei der primär chronischen Polyarthritis ist das CRP, ähnlich wie bei akuten bakteriellen Erkrankungen nur in der akuten Phase positiv (1,18), aber auch bei dem frischen Herzinfarkt und anderen, mit Zerfallerscheinungen einhergehenden Prozessen, nach Heuberger (40) sogar in 84,6%. Es geht in den entzündlichen Stadien vieler Krankheiten dem Anstieg der α_2-Globuline und der an Eiweiß gebundenen Kohlehydrate des Serums parallel (28).

Das C-reaktive Protein ist eine Fraktion im β_2-Globulinbereich, die beim Gesunden nicht vorkommt (97). Nach Cleve (18) dagegen, läßt es sich nicht einer ß-Globulinfraktion zuordnen. Die Immunelektrophorese identifiziert es aber eindeutig als schnell wanderndes γ-Globulin (98).

W. Müller (60) bezeichnet es in seiner Arbeit über die Bedeutung des C-reaktiven Proteins bei der Beurteilung der Aktivität akuter rheumatischer Erkrankungen als besonders feinen Indikator und hält es, ähnlich wie Feuerstein (28), in seinem Aussagewert für sicherer als die BKS.

Der Nachweis erfolgt zumeist mit speziellen Anti-CRP-Seren, die sich an Latexpartikel adsorbieren und durch den Latex-Fixationstest (LFT) abgelesen werden können.

Alle diese angeführten Eiweißlabilitätsprüfungen haben, wie gesagt, zwar für die Klärung der Dysproteinämien und zur Beurteilung der Aktivität ihre Bedeutung, sind aber für die Rheumadiagnostik nicht spezifisch genug.

Einen wesentlichen Schritt zur Klärung der Bluteiweißverhältnisse führte die Elektrophorese weiter, die zunächst eine Aufteilung des Serumeiweißes in 5 Fraktionen erlaubte. Schon in früherer Zeit waren Anstrengungen unternommen worden, Proteingemische im elektrischen Feld zu trennen.

1892 entdeckten Pincton und Lindner die freie Beweglichkeit des Hämoglobins im elektrischen Feld (7). Hofmeister gelang es gegen Ende des vergangenen Jahrhunderts, ein Protein, nämlich das Ovalbumin, durch Aussalzen in kristalliner Form darzustellen (98). Auf der weiteren Suche,neben dieser Fraktionierung Licht in die Struktur der Eiweißkörper zu bringen, untersuchte Michaelis in einem U-Rohr 1940 diese Zusammenhänge mit dem Isoelektrischen Punkt durch die Beobachtung der Wanderung von Enzymen in unterschiedlichen Lösungen verschiedener Wasserstoffkonzentrationen (98). Cohn konnte mit variierenden Aethanolfraktionen bei ebenfalls sich änderndem pH die einzelnen Eiweißfraktionen bestimmen (1,7). Field und Teague trennten elektrophoretisch im Agarrohr Toxin und Antitoxin des corynebakterium diphtheriae (98). Tiselius (98) gelang es 1937 zum ersten Mal, durch die Elektrophorese das Serumeiweiß in die 5 Hauptfraktionen Albumin, α_1-, α_2-, ß- und γ-Globuline auf Grund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld zu trennen. Damit war die bisherige, auf Aussalzung beruhende Einteilung in Albumine, Eu- und Pseudoglobuline überholt und durch eine bessere ersetzt (48, 102).

Die Elektrophorese wurde im Laufe der Zeit eine der wichtigsten Eiweißuntersuchungen überhaupt (38,52,53,92,98) und ist häufig mit den anderen, vorhin genannten unspezifischen Methoden zusammen, für die Beurteilung eines klinischen Verlaufes unentbehrlich. Neben ihrem großen Auflösungsvermögen verändert sie die makromolekuläre Eiweißstruktur kaum, da das elektrische Feld vor allem auf die peripheren Teilchenladungen einwirkt (63,102), was ja von großer Wichtigkeit ist.

Das Prinzip der Elektrophorese beruht darauf, daß die ampholyt gebauten Eiweißkörper in einem alkalischen Milieu entsprechend ihrer Ladung verschieden schnell im elektrischen Feld zur Anode wandern und sich damit auftrennen, was mit einer geeigneten optischen Einrichtung beobachtet werden kann. Diesem Prinzip muß der Versuchsaufbau durch optimale pH-Verhältnisse, geeignete Wanderungsmedien,

zweckmäßige Stromstärke etc. Rechnung tragen. Die Gammaglobulin-Fraktion, die am langsamsten im elektrischen Feld wandernde, erscheint als Einheit, stellt aber in Wirklichkeit eine Vielzahl von, zwar im elektrischen Feld gleichartig reagierenden, im übrigen aber unterschiedlichen Bestandteilen dar. Sie enthält zu 90% das kohlenhydratarme, niedermolekulare Gammaglobulin mit einem Molekulargewicht von 156 000 und einer Sedimentationskonstante von S_{20W}= 7 (20). Die abweichende Sedimentationskonstante von 18 - 20 Svedbergeinheiten und das Molekulargewicht von 900 000 besitzt das γ_1-Makroglobulin, das 10% dieser Fraktion ausmacht. Es ist kohlenhydratreich und identisch mit dem von Grabar beschriebenen β_2-Makroglobulin (20). Eine dritte Komponente der Gammaglobulinfraktion ist das β_2A-Globulin, das in seiner Sedimentationskonstante und seinem Molekulargewicht dem normalen 7 S- γ-Globulin entspricht (52). Wir finden diese Fraktion bei allen subchronisch und chronisch entzündlichen Prozessen vermehrt, ebenso ist das für die Rheumadiagnostik bedeutsame CRP dieser Fraktion zuzurechnen (98). Das β_2-Makroglobulin, welches als zwei Komponenten das β_{2M}- und β_{2A}-Globulin umfaßt und zur Gruppe der Immunglobuline gehört (98), enthält als Antikörper neben verschiedenen anderen das Rh-System und die Isoglutinine (20).

Die von Tiselius ursprünglich angegebene freie Elektrophorese wurde in einem Trennrohr durchgeführt, das aus 5 rechteckigen Glasküvetten zusammengesetzt ist.

Im Laufe der Zeit erfuhr diese Methode verschiedene Abwandlungen und Erweiterungen (Kunkel und Mitarbeiter 1954), und so wurde die heute viel benutzte Papierelektrophorese 1949 von Durrum (63) entwickelt, die eine leichte Markierung der einzelnen Fraktionen erlaubt, daneben sich aber auch zur qualitativen und semiquantitativen elektrophoretischen Analyse eignet (98). Die ersten Versuche dazu stammen aus dem Jahre 1939 von König und v. Klobusitzky (98).

Strichförmig werden die zu untersuchenden Gemische auf einen Filterpapierstreifen, der mit Pufferlösung getränkt ist, aufgetragen und in einer geschlossenen Kammer, an die eine Gleichspannung gelegt wird, in 12 - 15 Stunden aufgetrennt. Nach entsprechendem Trocknen und Färben werden die Streifen mit Hilfe eines

Photometers ausgewertet und ergeben eine vielzackige, dem mengenmäßigen Vorhandensein der einzelnen Anteile entsprechende Kurve. Durch die Verwendung von anderen Trägermedien, wie neuerdings von Acetatfolie (48,63,102) läßt sich hierin noch eine erhebliche Verbesserung in der Aufteilung erreichen.

Wenn man die Papierelektrophorese zur Klärung des Krankheitsbildes der primär chronischen Polyarthritis heranziehen will und der damit im Zusammenhang stehenden Änderung in der Zusammensetzung des Serumeiweißes, so muß man zuerst einen Normalwert suchen, mit dem die bei den Dysproteinämien vorliegenden Veränderungen verglichen werden können.

Versucht man diese Normalwerte der Literatur zu entnehmen, so finden sich unterschiedliche Angaben, wie sie folgende Tabelle in einer Auswahl zeigt:

Normalwerte der Elektrophorese in rel.% Angaben

	α_1	α_2	β	γ
Normalwerte der Med.Univ. Poliklinik München (25)	2-6	6-10	10-14	15-22
Müller-Seifert (63)	3-5	5- 9	9-14	12-18
Dole (24)	4,6	7,2	12,1	11,0
Armstrong (4)	5,3	14,0	13,4	11,0
Wunderly (109)	3,9	7,3	10,7	16,5
Riva (1)	3,1-6,6	5,2-9,1	6,1-12,1	10,3-18,4
Antweiler (1)	2,5-5,5	6,0-10,5	11,0-16,0	12,0-17,0

Antweiler (3) weist in seiner Arbeit über die quantitative Elektrophorese darauf hin, daß es keine vergleichbaren Absolutwerte gibt, sondern wir eine aus der unterschiedlichen Methodik resultierende Schwankungsbreite finden, abhängig vom pH-Wert, dem verwendeten Puffer etc.

Ferner sind diese Angaben bis zu einem gewissen Grade altersbedingt, erhalten wir doch für Kinder im ersten Lebensjahr und bei Personen über 50 Jahre erhebliche Abweichungen (90).

Die Dysproteinämie ist ihrer Definition nach eine quantitative Änderung in der Zusammensetzung der Bluteiweiße, wobei der Ausdruck als solcher ohne jeden weiteren klinischen Bezug lediglich eine Verschiebung von den oben ausgeführten Normalwerten angibt, und die Begleiterscheinung einer Vielzahl von Krankheitsbildern ist. Dabei ist die Abweichung von der Norm bei den α - und γ-Globulinen viel häufiger als bei den ß-Globulinen und wenn, dann im Zusammenhang mit den ersteren (48). Wuhrmann und Wunderly versuchten 1945 bestimmten Krankheitsgruppen bestimmte Eiweißkonstellationen zuzuordnen und fanden so den Typ der akuten Entzündung, den der subakuten, chronischen etc. (48).

Riva (1) dagegen läßt in seiner Typeneinteilung diese klinischen Kategorien fort und geht vom reinen elektrophoretischen Bilde aus, und gibt z.B. eine seiner Gruppen als von der γ-Globulinvermehrung bis zu 20% beherrscht an. Dieses Bild weist die primär chronische Polyarthritis auf. Eine andere Gruppe ist durch die Vermehrung der ß-Globuline gekennzeichnet. Bei diesem letzten Typ, der nach Riva der chronischen Entzündung angehört, findet man den Gesamteiweißwert in den meisten Fällen nicht erhöht, doch kann er auch vermehrt, oder auch vermindert sein. In jedem Falle ist eine beschleunigte BKS zu beobachten und aus der Reihe der unspezifischen Eiweißlabilitätsproben ein verbreitertes WKB und eine positive CSR (48).

Bei akuter Polyarthritis dagegen, geht die Vermehrung der α-Globuline mit oder ohne ß-Globulinzunahme mit einem zumeist normalen Gesamteiweiß einher, einer beschleunigten BKS, einer positiven CSR, einer negativen Takata-Reaktion und einem verkürzten WKB (48). Physiologisch sind in der Altersgruppe von 50-55 Jahren die γ-Globuline, nicht aber andere Globuline regelmäßig vermehrt, wie Schultze und Schwick angeben (90). Die akut verlaufenden Formen und die entzündlichen Schübe zeigen eine Albuminverminderung, eine Erhöhung der α_2-Globuline und eine Verminderung der ß-Globuline, während im chronischen Stadium der p.c.P. stets eine Vermehrung der γ-Globuline anzutreffen ist (1,3,18).

Deswegen teilt Wuhrmann (43) die p.c.P. in einen Typ mit α- und ß-Globulinerhöhung und einen anderen mit isolierter -Globulinerhöhung ein.

Kukowka (43,50) findet bei 200 Patienten mit p.c.P.:

in 48% eine α - und γ -Globulinerhöhung
in 28% eine isolierte γ -Globulinerhöhung
in 12% eine α -Globulinerhöhung
in 8% eine ß- und γ -Globulinerhöhung
in 4% eine α - und ß- und γ -Globulinerhöhung

Er kann in seinen Untersuchungen den Anstieg der γ -Globuline bei Polyarthritikern nicht sicher nachweisen und mißt so den Ergebnissen wenig Bedeutung bei, weil seiner Meinung nach die Zahl der untersuchten Patienten zu klein war (50).

Während er als Mittelwert bei Erwachsenen

ß -Globuline 11,34 %
γ -Globuline 17,00 %

findet, hat er als Ergebnis bei 200 Patienten

ß -Globuline 14,90 %
γ -Globuline 25,46 %

als Durchschnittswert bei Polyarthritis chronica gefunden.

Schettler (50) findet bei 19 Patienten

in 13,80 % eine ß-Globulinerhöhung
in 30,80 % eine γ-Globulinerhöhung

Kukowka (50) meint, daß den Veränderungen keine Spezifität für die Polyarthritica chronica zuzumessen sei, da diese Veränderung auch bei anderen Krankheiten feststellbar sei.

Schettler schenkt neben quantitativen Veränderungen der Serumeiweißkörper auch dem Quotienten Glob/Alb (γ/A) Beachtung. Dieser ist in allen 19 Fällen gegenüber den Normalwerten um 0,3 deutlich erhöht (50).

Ferner wertet er die Persistenz der hohen α -Fraktion als besonders ungünstiges Zeichen zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes und des therapeutischen Erfolges (87).

Wenn auch die Elektrophorese mit ihrer Auftrennung in 5 Fraktionen einen wesentlichen Beitrag zur Diagnose und Einteilung der Dysproteinämien lieferte, so war doch diese Aussage nicht erschöpfend genug und erforderte eine Fortentwicklung. Grabar und Williams erbrachten sie unter dem Namen der Immunelektrophorese, als sie 1955 die elektrophoretische Auftrennung im Gel mit einer anschließenden Gegendiffusion verbanden (1,84). Es gelang so, die Proteingemische statt in die klassischen 5, in etwa 30 Fraktionen aufzutrennen (7,77,84). Scheidegger verminderte erheblich die Menge der benötigten Seren und Antiseren, sowie die Diffusionsdauer und schuf damit eine außerordentlich leistungsfähige Mikromethode.

Die Auftrennung erfolgt so, daß anschließend an die Elektrophorese in eine Rille des Agars, die parallel zu der erfolgten elektrophoretischen Wanderung verläuft, Antiserum aufgetragen wird, das gegen das menschliche Serumprotein wandert und Präzipitationslinien sich da ausbilden, wo entsprechendes Antigen und Antikörper einander treffen. Nach geeigneter Färbung, zum Beispiel mit Amidoschwarz, stellen sich die feinen, in ihrer Lage charakteristischen Linien bogenförmig dar. Je breiter das Antikörperspektrum in den Antiseren ist, desto zahlreicher werden die sich ausbildenden Präzipitationslinien.

GELDIFFUSIONSMETHODEN UND IHRE MODIFIKATIONEN

In der Serologie ergibt sich in zunehmendem Maße beim Vorhandensein von verschiedenen Antigenen und Antikörpern die Notwendigkeit einer exakten und spezifischen Trennungsmethode.

Die Vorläufer finden wir schon zur Zeit der Jahrhundertwende, als Bechhold (73) 1905 die Geldiffusionsmethode angibt, die dann in den vierziger Jahren in die Immunologie als wertvolles Diagnostikum eingeführt wurde.

Ouchterlony, dem wir die elegante Verfahrensweise zur Prüfung der toxinproduzierenden Kapazität der Diphtheriebakterien verdanken, stellte durch seine Arbeiten in "Progress in Allergy" V und VI (73,74) einen wertvollen Überblick über die heute gebräuchlichen Techniken zusammen, der wir in unserer chronologischen Darstellung weitgehend folgen.

Die ersten Präzipitationsreaktionen zwischen Antigen und Antikörper wurden 1897 von Kraus (73) veröffentlicht, bald darauf folgte die Verbesserung der Originaltechnik durch Uhlenhuth im Jahre 1903 und sechs Jahre später beschrieben Calmette und Massol zum ersten Male eine besondere Präzipitationsweise, die Flockungsreaktion, wo beim Mischen von bestimmten Anteilen von Kobratoxin und Antitoxin eine Flockungsreaktion zusammen mit einer Neutralisation eintrat. Diese Versuchsanordnung benutzten Nicolle, Césari und Debains (73) 1920, um mit dem sogenannten Ringtest, bei dem ein reagierender Bestandteil in der Gelatine gelöst ist, Diphtherietoxin und Antitoxin zu prüfen. Nach diesen ersten Versuchen mehren sich die Variationen, und wir finden in den Publikationen Zusammenstellungen der dabei gemachten Beobachtungen. Ramon (73) verfeinerte die Technik der quantitativen Bestimmung der Substanzen in vitro und beobachtete gleichzeitig die Zeit, die für eine sichtbare Toxin- und Antitoxin-Flockung im Glas nötig war, bei Anwesenheit einer gleichbleibenden Menge Antigen, aber einer wechselnden Menge Antikörper. Gleiche Mengen von Toxin sowie Antitoxin benötigten zur Flockungsreaktion die kürzeste Zeit. Er nannte das Verhältnis Antigen zu Antikörper (73), bei dem in der kürzesten Zeit eine Flockulation eintrat, wie es auch bei der Wiederholung der Versuche 1926 Dean und Webb taten, die

optimale Proportion oder auch optimale ration (OR).

Das Maß, in dem diese Präzipitation oder Flockung eintritt, hängt von vielen Faktoren ab.

Poulik und Smithies erklären und Ouchterlony (70) bestätigt, daß die Wanderungsgeschwindigkeit der Antigene und Antikörper, die zur Präzipitation führt, durch die Größe der Moleküle, die im Netzwerk der Gelstruktur festgehalten werden, bestimmt wird. Smithies gibt ergänzend als Grund eine gewisse, durch die Moleküle bedingte Reibung an (70). Bechhold und Ziegler (11) erwähnen, daß die Gegenwart von Elektrolyten und Nichtelektrolyten die Durchlässigkeit von Gelatine und Agargelen für die Diffusion dritter Stoffe, z.B. Farbstoffe beeinflußt, wobei Na_2SO_4, Traubenzucker, Glycerin und Alkohol die Durchlässigkeit mindern, während Harnstoff begünstigend auf die Durchlässigkeit dieser Medien wirkt. Ebenso erhöht NaCl den Agarschmelzpunkt, dagegen Traubenzucker und Glycerin setzen ihn herab. Friedmann und Kraemer (73) unterstützten diese Beobachtung und ergänzen, daß die Diffusion von Substanzen im Gel abhängig ist:

Von der Art der Agarbereitung, vom optimalen pH, dem isoelektrischen Punkt und der eventuellen Anwesenheit anderer Substanzen, seien es Elektrolyte oder Nichtelektrolyte.

Ouchterlony gibt an (73), daß die Diffusion von Substanzen im flüssigen Medium nach dem Fickschen Gesetz von 1885 abläuft

$$\frac{dQ}{dt} = - DA \frac{(dC)}{(dx)} \quad \text{wobei}$$

Q der Anstieg der diffundierenden Substanz ist, welche in der Zeit t einen Abschnitt A durchwandert, wo der Konzentrationsgrad $\frac{dC}{dx}$ ist, und D = Diffusionskoeffizient, gemessen in cm^2/sec. Letzterer nimmt bei steigender Temperatur zu. Diffundieren große Moleküle, z.B. Proteine in ein Medium, das kleine Moleküle enthält, so ändert sich der Diffusionskoeffizient umgekehrt der Quadratwurzel des Volumens der Moleküle in Lösung (73). Er läßt sich für jedes Medium bestimmen. Graham sieht 1860, daß die Moleküle von Substanzen in nicht sehr dicken Gelen mit einem kleinen Format in annähernd gleicher Menge wie im Wasser

diffundieren, daß also hier die Agarstruktur wie ein großmaschiges Netz wirkt.

Wodehouse (107) weist in einer Arbeit über die Analyse von Pollenextrakten mittels der Geldiffusionstechnik auf den Einfluß der Temperatur auf die Diffusion hin. Eine Erhöhung bewirkt bis zu einem gewissen Grade eine Verkürzung der Reaktionszeit, - wohl entsprechend der RGT-Regel - und einen relativ großen Anstieg der Diffusionsrate. Den Beweis lieferte er dadurch, daß er einen exakten Versuchsansatz bei 32°C, den anderen im Eisschrank bei 2- 5°C aufbewahrte. Dagegen verneint er bei den unterschiedlich benutzten Konzentrationen von Agar einen entscheidenden Effekt in der normalen Schwankungsbreite zwischen 0,6% und 1,5%, darunter ist er jedoch stärker hervortretend. Eine Agarstärke von 3% ist zu undurchsichtig, um noch eine befriedigende Ablesung zu gestatten.

Bei der Diffusion von Substanzen in Gel tritt unter besonderen Umständen ein rhythmisches Präzipitationsphänomen auf, das Liesegangphänomen (64,73). Es sind dies stehende kreis- oder bandförmige Ringe um das Diffusionszentrum, wobei der Abstand der einzelnen Präzipitate vom Diffusionszentrum der Quadratwurzel von der Zeit entspricht, die zur Erscheinung der Ringe benötigt wurde. Es gibt verschiedene Erklärungen dafür, die aber alle nicht befriedigen. Nach Bechhold (10) und später Ostwald entsteht dieses von R.E. Liesegang 1898 beschriebene Phänomen dadurch, daß man ein Salz in Gelatine löst und danach in die erstarrte Gelatine ein anderes diffundieren läßt, welches mit dem ersten einen Niederschlag bildet, z.B. Ammoniumbichromat und Silbernitrat. Bei Diffusion des Silberchromates bildet sich keine ununterbrochene und gleichmäßige Trübung, sondern sie verläuft in konzentrischen Ringen um den Tropfen. Der Raum zwischen den einzelnen Ringen bleibt ziemlich frei von Silberchromat. In einer früheren Arbeit weist Ouchterlony (73) darauf hin, daß die bei seinen Untersuchungen von Antikörper-Antigenreaktionen in Agargel sich ausbildenden Präzipitationslinien zwar so aussehen, aber nicht das Ergebnis des Liesegangphänomens sind, vielmehr stellen sie die individuelle Reaktion zwischen verschiedenen Antigenen und Antikörpern dar. Einen weiteren Faktor gibt Ouchterlony an, der die Diffusion in Gel und die Lage der Präzipitationslinien beeinflußt. Er vermerkt, daß die Lage der Präzipitate bei Konstanterhaltung aller anderen Faktoren von den anfänglichen Konzentrationen der reagierenden Substanzen abhängt (65).

Je höher die anfängliche Konzentration einer der Komponenten bei gleichbleibenden anderen Bedingungen ist, desto weiter vom in Frage stehenden Diffusionszentrum erscheint die Präzipitationslinie.

Nach einer Übersicht von Ouchterlony (67) kann man zusammenfassend sagen: Die Lage der Präzipitationslinien in Beziehung zu den Diffusionspunkten beruht auf den Anfangskonzentrationen der beteiligten Reagentien, der Diffusionsrate, der Zeit und der Löslichkeit des Antigen-Antikörper-Komplexes.

Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche methodische Änderungen und Verbesserungen angegeben, und so war es nötig, sie nach größeren Gesichtspunkten zusammenzufassen.

So unterscheidet man einfache Präzipitationssysteme, wo nur ein Antigen mit seinem entsprechenden homologen oder heterologen Antikörper reagiert, zusammengesetzte Systeme, mit verschiedenen, voneinander kaum unterschiedlichen Antigenen, die mit einem einzigen Antikörper reagieren und multiple Systeme mit mehreren Antigenen und entsprechenden Antikörpern. Ferner unterteilt man sie (12) in einfache Diffusionen, wo nur ein Bestandteil, zumeist ein Antigen in das Gel diffundiert, das eine bestimmte Antikörperkonzentration enthält, und im Gegensatz dazu diffundieren im Doppelsystem beide reagierenden Substanzen in ein Gel, das keines von beiden enthält. Diese Form z.B. liegt der Ouchterlony-Methode zugrunde. Jede dieser Gruppen kann nun wieder, je nach Versuchsaufbau, in ein bis drei Dimensionen diffundieren.

Während früher die Zubereitung des Agars schwierig und zeitraubend war, hat sich das nun durch die industriellen Fertigpräparate wesentlich vereinfacht.

Petrie (73) beschreibt 1932 nach seinen Versuchen mit Bakterienkolonien, daß eine halbmondförmige Präzipitation sich um die Immunseren enthaltende Mitte ausbildet, allerdings nicht bei allen untersuchten Stämmen und nicht bei Rauhformen. Der Autor hält diese, in der Folgezeit als "Halophänomen" häufig beschriebene Darstellungsweise, für eine typenspezifische Immunpräzipitation (73).
Oudin (73) beschäftigte sich 1946 mit den Prinzipien einer immunologisch analytischen Methode, die er in einem Agargel an Hand der "tube diffusion" studierte.

Er benutzte agargefüllte Glasküvetten mit einem geeigneten Anteil von Immunseren, auf die nach Abkühlung des flüssigen Agars das entsprechende Antigen geschichtet wird (12,73). Bei konstanter Temperatur und geeigneten sonstigen Versuchsbedingungen bildet sich die Präzipitationsreaktion in Gestalt von mehr oder weniger deutlichen Ringen und Bändern im Gel aus, die entsprechend der fortlaufenden Diffusion kontinuierlich weiterwandern. Setzt man voraus, daß ein Antigen und ein Antikörper in geeigneten Konzentrationen die Ausbildung eines Bandes veranlassen, so stellt die Zahl der sichtbaren Ringe das Minimum der anwesenden Antigene dar (15). Die stärkste Ausprägung des Bandes ist proportional der Antikörper-Konzentration, aber unabhängig von der Antigen-Konzentration.

Der Motor gleichsam für das Vorrücken des Präzipitationsbandes ist das Wechselspiel zwischen der Menge der freien Antigene, die in den Agar diffundiert und der der Antikörper, die das Einwandern der Antigene und damit die Bewegung des Bandes bremsen.
Je größer diese eindiffundierende Menge ist, desto stärker ist auch die Verzögerung in der Ausbildung der Präzipitationslinien, ja, es kann bei einer zu großen Menge Antikörper oder einer zu kleinen der Antigene dazu kommen, daß gar keine Linie sichtbar wird (12). Oudin (73) untersuchte auch den Einfluß der Temperatur auf die Ausbildung der Präzipitationslinien und stellte fest, daß bei plötzlichem An- oder Abstieg sich artifizielle Bänder ausbildeten, die sich aber von den regulären dadurch unterscheiden, daß sie nicht wie diese wandern.

Auf Grund seiner Versuche korrigierte er auch die bisher gültige Erklärung der Liesegangschen Ringe dahin, daß nach seinem Dafürhalten die Präzipitationszone im Gel von zahlreichen, nicht miteinander interferrierenden Antigen-Antikörpersystemen herrührt (73). So gestalteten sich Oudins Versuche, später unter Mitwirkung von Becher und Munoz (73), zu einer wertvollen Möglichkeit, Immunsysteme zu analysieren.

Scheiffarth, Götz und Soergel (83,85) ergänzen diese grundlegenden Überlegungen durch ihre immunelektrophoretischen Studien über heterologe Präzipitationsreaktionen. Sie beschäftigen sich dabei intensiv mit den homologen und heterologen Präzipitationen in Gel. Wird bei ersteren das Komplement

gebunden, so geschieht das bei den heterologen nicht, und diese sind z.B. in ihrer Ausbildung von der Reaktionsdauer abhängig, der Diffusionsfähigkeit von Antikörpern und Antigenen, sowie der Intensität, mit der sich diese an die Antikörper binden. Auch die Art der Ausflockung variiert; finden wir bei den homologen Präzipitationsreaktionen große und lockere Präzipitationsflocken, die sich bei einem Überschuß von Antigen auflösen, so sind diese bei den heterologen klein und dick (83).

Bei der Methode nach Oudin bilden sich, entsprechend den reagierenden Systemen, Präzipitationslinien aus, doch ist diese Auftrennung ungenau, da jede der auftretenden Linien durch ein Gemisch verschiedener, aber gleich schnell diffundierender Antigene gebildet wird (45). Die Methode nach Ouchterlony und die hier eingeführte zweite Dimension erlaubt es, verschiedene, aber gleichartig wandernde Antigene aufzutrennen und miteinander zu vergleichen.

Der Schwede Örjan Ouchterlony gab im Jahre 1947 eine zweidimensionale Agardiffusionsmethode an, mit der in einem Test mehrere Antigene untereinander verglichen und gedeutet werden konnten (45,64-74).

Auf einer Agarplatte ordnet man ausgestanzte Löcher an, in die in einer bestimmten Verdünnungsreihe die zu untersuchenden Seren gefüllt werden, welche nun gegen das in einem Mittelloch befindliche Antiserum diffundieren und eine Präzipitationslinie ausbilden. Diese Methode, die ja selbst eine Weiterführung früherer Erkenntnisse der Immunologie darstellt, erfuhr teilweise durch Ouchterlony, selbst aber auch durch Grabar, Wadsworth (73), Kaminsky (46), sowie Björklund et al. verschiedene Modifikationen und durch die speziellen Fragestellungen bedingte Abwandlungen (2,42,75). War diese Untersuchungsweise 1947 ursprünglich zur Prüfung der Toxität von Diphtheriebakterien angegeben worden, dann u.a. zur Untersuchung von Graspollen (5) und anderer Allergien auslösender Faktoren (93,27), zur Prüfung von Sehnen und Knorpelextrakten (29), so stehen heute Serum- und Eiweißuntersuchungen allgemeiner und pathologischer Art im Vordergrund (9,47,71,76,82,88,104,105).

Fünfzehn Jahre später zeigt ein Katalog der Anwendungsgebiete seiner Technik

in Ouchterlony's Arbeit "Diffusion in Gel Methods for Immunological Analysis II" (74) einen beachtlichen Platz innerhalb der anderen immunologischen Nachweise auf.

Da unserer Arbeit auch diese Methode zugrunde liegt, wollen wir kurz vor allem auf die von Ouchterlony selber angegebenen Modifikationen eingehen, die den Weg dieser Methode und die schon erprobten Abwandlungen in kurzer Form aufzeigen soll. Bei der "cup and plate" Technik (73) wird in eine Petrischale eine ca. 2 mm dicke Schicht Agar von 1% Stärke gegossen, der mit dem zu untersuchenden Antiserum versetzt wurde. Bringt man in geeignete runde Vertiefungen Antigene und bebrütet die Schalen bei einer konstanten Temperatur z.B. von 37°C, so bilden sich nach 48 Stunden bei Vorhandensein von Antigenen und entsprechenden Antikörpern in geeigneten Konzentrationen um die Löcher Präzipitationslinien aus, bei einer geringen Menge von Immunseren dagegen ein Hof mit einem großen Durchmesser. Die Ringe stellen kein Liesegangphänomen dar, sondern sind nur durch die Präzipitation bedingt (65,73).

Wie auch in allen folgenden Modifikationen bilden sich die Linien dort aus, wo die reagierenden Substanzen in optimalen Verhältnissen aufeinandertreffen, wichtig ist auch hier die genügend hohe Anfangskonzentration, die erst die Präzipitation ermöglicht (69). Beim Durchwandern des Gels wird das Präzipitationssystem aufgebaut (14).

Diese Methode gibt also nicht nur einen Hinweis darauf, ob und welche Antigen-Antikörperpaare vorliegen, sondern sie ermöglicht es auch, sehr kleine Mengen nachzuweisen (15).

Der Versuchsaufbau läßt sich nun so variieren, daß in der "two basin plate" Technik mit einem heißen Agar gearbeitet wird, der aber nicht mit einem Serum versetzt ist. In den Agar werden Stanzen eingestellt, die je nach Aufgabenstellung runde oder dreieckige Löcher aussparen. Jedes dieser 2 - 3 mm tiefen Löcher wird mit dem zu untersuchenden Antikörper oder Antigen versetzt, das durch den Agar diffundiert und eine Präzipitation bildet. Die Ablesung erfolgt wieder makroskopisch gegen einen dunklen Hintergrund (73).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Zahl der Vertiefungen und damit der diffundierenden Systeme zu ändern oder sie nicht parallel, sondern im rechten Winkel zueinander zu stellen und so eine genaue Aufschlüsselung der Präzipitationslinien zu erlangen. Wir sehen also, daß die häufige Anwendung der Ouchterlony-Methode neben ihrer starken Aussagekraft wohl auch auf diesen großen Variationsmöglichkeiten beruht, die ein Anpassen an die jeweilige Fragestellung erlauben.

Durch diese stets wechselnden Fragestellungen erfahren auch die immunologischen Fakten ein erneutes Durchdenken, wie wir es z.B. bei Feinberg (26) oder bei Hayward und Augustin (36,74) erleben, die neue quantitative Methoden erarbeiteten.

Ähnlich wie Wadsworth (74) in Ouchterlonys Laboratorium eine Mikromethode entwickelte, die mit erheblich geringeren Materialmengen exakte Aussagen lieferte, fanden diese eine Mikromethode, in ihrer "polygon plate" Technik, bei der sie auf Ouchterlony-Platten um einen Mittelpunkt Löcher mit der zu untersuchenden Verdünnung anordneten und diese gegen das antiserumhaltige Mittelloch diffundieren und eine Präzipitationslinie bilden ließen.

NATUR UND NACHWEISMETHODEN DES RHEUMAFAKTORS

Während der letzten Jahre erlangte in der serologischen Rheumadiagnostik neben den schon traditionellen Nachweisen, wie sie die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und die klassischen Eiweißuntersuchungen darstellen, die Bestimmung des Rheumafaktors (RF) eine steigende Bedeutung. Der Wert liegt nicht nur in seiner differentialdiagnostischen Aussage bei der Abgrenzung der p.c.P. von ähnlichen Krankheitsbildern (108), sondern läßt die Vermutung aufkommen, daß hierin ein wichtiger Hinweis für die Pathogenese dieses Leidens zu finden ist. Während v. Kress (63), ähnlich wie Heuberger (40) meint, daß die immunologische Deutung dieses Faktors noch ausstehe und nur erklärt, daß es sich bei dem RF, der im Serum von Patienten mit primär chronischer Polyarthritis zu finden ist, um ein makromolekuläres Gamma-Globulin handelt, das eine Hämagglutination mit Hammelblutkörperchen bewirkt, die vorher mit Kaninchen Amboceptor sensibilisiert wurden, und das die Fähigkeit hat, mit normalem γ-Globulin zu reagieren, - so ist die Klärung in den letzten Jahren doch erheblich vorangekommen.

Heilmeyer (37) beschreibt ihn als einen für die chronische Polyarthritis charakteristischen Serumfaktor, der als Makroglobulin der β_{2M}-Fraktion zuzurechnen sei und mit tierischem und menschlichem Gamma-Globulin reagiert.

Der Nachweis des RF, der in 65 - 85% der Fälle von p.c.P. gefunden wird (17, 23) gelang Ziff (1,23) 1956 mit dem empfindlichen Hemmungstest in allen geprüften Seren. Heute wird er zumeist mit dem Latexfixationstest bestimmt. Es handelt sich vermutlich um einen Antikörper, der sich gegen Reaktionen von Bakterienantigenen mit den entsprechenden Antikörpern richtet (1). Harter (34) ergänzt, daß der Rheumafaktor zwar bei der p.c.P. gehäuft, bei anderen rheumatischen Erkrankungen in geringerem Maße, bei nicht rheumatischen dagegen höchst selten angetroffen wird (1). Christ (17) vermerkt, daß größere Untersuchungsreihen in 75% der Fälle bei Vorliegen einer primär chronischen Polyarthritis einen positiven Nachweis des Rheumafaktors ergaben. Vaughan (99) nennt den RF ein Makroglobulin, mit einem Molekulargewicht von 1 Million, das zur gleichen Gruppe gehört, wie z.B. die heterophilen Antikörper, die Kälteagglutinine und

die Blutgruppensubstanzen. Sie sind ein geringerer Teil der γ-Globuline, wobei die größere Menge speziell den 7-S-γ-Globulinen zuzurechnen sei.

Behrend und Cleve (13) berichten in ihrer Arbeit über immunelektrophoretische Untersuchungen von Ultrazentrifugenpräparaten bei p.c.P., daß der Rheumafaktor, ein in destilliertem Wasser lösliches Euglobulin, in der Kälte ausfällt und seiner elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit nach dem γ_1-Globulin entspricht. Untersucht man ihn mit der Ultrazentrifuge, so findet man ihn in der Makroglobulinfraktion, die 10% der Gammaglobuline umfaßt, mit einer Sedimentationskonstante von 19 S und einem Molekulargewicht von 900 000. Die immunelektrophoretische Prüfung bei der chronischen Polyarthritis zeigt in einem erhöhten Maße ein β_2-Globulin, das auch - allerdings in geringerem Maße - im Normalserum zu finden ist. Jedoch konnte keine quantitative Beziehung von der Titerhöhe im Hämagglutinationstest nach Waaler-Rose und der in der Immunelektrophorese auftretenden Makroglobulinpräzipitate festgestellt werden. Die Angaben über die chemische Struktur des RF ergänzt Kunkel (51), der durch eigene Arbeiten fand, daß dieser zu 5,1 - 5,4% aus Hexosen, 2,0 - 2,9% aus Hexosamin, 1,7 - 1,8% Neuraminsäure, 9,8 - 10,1% Polysacchariden und zum Rest aus Aminosäuren besteht. Chemisch ist er also den normalen 19-S-γ-Globulinen zuzureihen.

Diese Befunde erlaubten die Annahme, daß der RF der physiologischen β_{2M}-Globulinfraktion (S_{20}=19) weitgehend gleichzusetzen ist, doch kann er mit leicht veränderten 7-S-γ-Globulinen einen Komplex eingehen. Müller-Eberhard, Kunkel et al. (59) fanden bei einem gewissen Prozentsatz von Patienten mit p.c.P. ein pathologisches Serumeiweiß, das in der Ultrazentrifuge als 22-S-Komponente sedimentiert und einen löslichen Komplex aus 19-S- und 7-S-Gammaglobulinen darstellt. Er kommt dadurch zustande, daß hier das schwere Gammaglobulin in der Lage ist, leicht verändertes 7-S-Gammaglobulin zu binden, das in einem geringen Prozentsatz im Serum vorhanden ist. In einem solchen Komplex sind 4 leichte und ein schweres Molekül zu finden. Wird ein erhitztes Gammaglobulin dem Rheumatikerserum zugegeben, so werden die noch ungenutzten Bindungsmöglichkeiten des 19-S-Moleküls besetzt und der Komplex präzipitiert

schließlich, wenn er eine Löslichkeitsgrenze überschreitet. Sollte es sich beim 19-S-Gammaglobulin im Serum von chronischen Polyarthritikern um Antikörper handeln, so sind diese entweder gegen das leicht geänderte Gammaglobulin gerichtet, das dadurch Antigencharakter erhält, oder gegen ein noch nicht bekanntes anderes Antigen.

Svartz (94) bemerkt, daß der RF an ein Makroglobulin mit dem Sedimentationskoeffizienten von ca. 18,7 gebunden ist. Imre (44) konnte experimentell feststellen, daß der Rheumafaktor bei Kaninchen ein Antiserum erzeugt (100), das deutlich den Charakter eines Anti $ß_{2M}$-Serums trug, was durch eine deutliche Präzipitationslinie gegen Anti $ß_{2M}$-Globulinserum in der Doppeldiffusions-Agarplatte bestätigt wurde. So läßt sich daraus folgern, daß dieses Makroglobulin auch den Hauptbestandteil des RF ausmacht. Im Sammelreferat über den RF in der Rheumadiagnostik von Mathies (55) finden wir eine Reihe von physikochemischen und immunochemischen Daten zusammengetragen. Danach sehen wir ihn neben den α-und γ-Globulinen bei der Cohnschen Aethanolfraktion des Serums in der III. Fraktion, und in der Papierelektrophorese wandert er nach Scheiffarth mit der γ-Globulinfraktion zwischen der ß- und γ-Fraktion. Physikochemisch entspricht seine Kohlehydratzusammensetzung der eines 7-S-Globulins, also ähnlich wie Kunkel (51) es schon angegeben hatte. Ziff (110) beschreibt ihn als hitzebeständig, säurestabil, jedoch labil im alkalischen Milieu. Die Frage, ob der RF wirklich seinem Verhalten nach ein Autoantikörper ist, bleibt noch bestehen, ebenso wie die Frage seiner Entstehung. Während Svartz ihn für ein Stoffwechselprodukt, das durch fehlgesteuerte, möglicherweise durch einen Mikroorganismus wie der Streptokokkus B einer ist, ausgelösten enzymatischen Prozeß (97) hält, der dann wiederum die Bildung von bestimmten Makroglobulinen anregt, zu dem der RF zählt, vertritt Miehlke (57) die Meinung, daß der Vorgang sich so abspielt, daß durch die rheumatische Entzündung Veränderungen in der Struktur der Gewebseiweiße auftreten, die als Autoantigene wirken, wogegen wiederum der Gewebsautoantikörper gebildet wird.

Zusammenfassend läßt sich wohl sagen, daß der Rheumafaktor weder für die primär chronische Polyarthritis streng spezifisch, noch regelmäßig nachweisbar ist (1,57,99),

aber differentialdiagnostisch eine große Bedeutung hat, zeigt er doch eine bestimmte Reaktionslage des Organismus an. Meistens läßt er sich beim ersten Auftreten einer rheumatischen Arthritis nachweisen.

Folgende Nachweismethoden gewinnen durch ihre verfeinerte Technik zunehmend an Bedeutung:
Müller (1) teilt sie in 4 Gruppen ein:

1. Agglutinationsreaktionen
2. Präzipitationsreaktionen mit γ-Globulinen
3. Inhibitionsteste
4. Absorptionsteste

Sie beruhen alle darauf, daß das γ-Globulin an bestimmte Partikel gebunden, mit diesen eine Agglutination ergibt.

Von den zahlreichen Reaktionen mögen hier nur diejenigen erwähnt werden, die in die Rheumadiagnostik Eingang gefunden haben und dort routinemäßig verwendet werden. Taubner (97) empfiehlt, ähnlich wie bei dem großen Angebot an Leberfunktionsprüfungen, auch hier sich auf wenige, aber charakteristische Untersuchungen zu beschränken; so schlägt er zum Beispiel neben der Bestimmung der BKS und CRP den Antistreptolysintiter und den Latexfixationstest vor, bei negativem Ausfall des letzteren den modifizierten Ziff-Test nach Klein.

Alle in der Rheumaserologie verwendeten Nachweise machen sich die Erkenntnis zunutze, daß der Rheumafaktor eine Bindung in Form der Agglutination oder Präzipitationsreaktion einzugehen vermag (18). Auch der Waaler-Rose Test basiert auf dieser Grundlage (34,81,101). Dean fand 1912 in der Gammaglobulinfraktion von Meerschweinchen einen thermostabilen Faktor, der mit Kaninchenantiserum sensibilisierte Erythrocyten vom Hammel agglutinierte, Meyer wiederholte und bestätigte 10 Jahre später diesen Versuch mit Humanserum (57). Der Norweger Waaler entdeckte im Jahre 1937 bei Routineuntersuchungen, daß Seren von primär chronischen Polyarthritispatienten durch sensibilisierte Hammelblutkörperchen agglutiniert wurden. Das Gammaglobulin, das den Rheumafaktor bei diesem Test bindet, ist ein Antikörper, den ein Kaninchen bildet (Ambozeptor), das vorher gegen Hammelerythrocyten sensibilisiert wurde (21).

Zum Test wird es soweit verdünnt, daß es gerade die Hälfte derjenigen Antikörpermenge enthält, die zu einer Verklumpung der Blutkörperchen führen würde (78). Dieser vorausgegangenen Sensibilisation bedarf es unter allen Umständen, da eine Agglutination mit normalen Schaferythrocyten nicht eintritt.

Der "activing factor", wie ihn Waaler nannte, kommt zwar hauptsächlich im Rheumatikerserum vor, ist aber für dieses nicht charakteristisch. Er untersuchte 48 Fälle und sah, daß menschliche Seren den Effekt beim Vorhandensein von unterschiedlich hohen Mengen zeigten, jedoch die Rheumatiker am empfindlichsten reagierten (101).

Bei einer Bindung des Rheumafaktors an diese sensibilisierten Hammelerythrocyten kommt es zu einer Agglutination, bei der die Menge des im Patientenserum vorhandenen Rheumafaktors durch den Titer einer Verdünnungsreihe von 1:16 bis 1:1024 ermittelt wird. Der Bewertung liegt als Differentialagglutinationstiter der Titerwert zugrunde, der mit sensibilisierten Erythrocyten erreicht wird, im Verhältnis zur Agglutination von Schaferythrocyten, die durch einen heterophilen Antikörper veranlaßt wird. Eine Serumverdünnung von 1:16 bzw. 1:32 gilt als normal, darüber liegt ein positiver Waaler-Rose-Test vor (21,33). Er fiel in 66%, der Latextest dagegen in 78% von primär chronischer Polyarthritis positiv aus. Dabei erwies er sich als etwa um das Doppelte spezifischer als der Latextest (49,79).

Dieser Test, der heute durch technisch einfacher zu handhabende ersetzt ist, erfuhr verschiedene Abwandlungen, so die Modifikation von Svartz und Schlossmann 1954, die ein Kältepräzipitat verwandten, das den Rheumafaktor angereichert enthält; Heller, Jakobsen und Ball vereinfachten den Nachweis, indem sie den heterophilen Antikörper absorbierten und nun den gefundenen Titer an der Verdünnungsreihe direkt ablesen konnten (57).

Mit dem Latexfixationstest (LFT) bekamen Singer und Plotz ein positives Ergebnis bei 70% der Rheumapatienten; als dann statt des Rheumaserums eine Euglobulinfraktion verwendet wurde, stieg der Prozentsatz bis auf 90% (22). Je sicherer die klinische Diagnose einer p.c.P. ist, desto höher erweist sich der prozentuale Ausfall der positiven Latexfixationsteste (79).

Der Latextest, der heute allgemein als Latexschnelltest modifiziert gebräuchlich ist, bietet neben einer guten diagnostischen Sicherheit eine technisch leichte Handhabung (38, 103). Es wird eine kommerzielle Lösung benutzt, in der das Polyvinylderivat Latex mit einer Größe von 0,81 µ das Gammaglobulin adsorbiert. Kommt es zu einer Zugabe von Rheumatikerserum, so reagiert das Gammaglobulin mit diesem, wobei der Latex agglutiniert (38). Der Agglutinationsgrad wird makroskopisch abgelesen, die Bewertung des Testes erfolgt nach Latex ∅ +, ++, +++ (1,33).

Nach Müller (61,62) schließt ein negativer Ausfall des Latextropfentestes das Vorhandensein einer chronisch rheumatischen Erkrankung mit großer Wahrscheinlichkeit aus. Für die p.c.P. ist er weitgehend spezifisch und für die Differentialdiagnose von Bedeutung, da er nie bei degenerativen Gelenkerscheinungen, bei Morbus Bechterew und Rheumatoiden so gut wie nie positiv ausfällt (61).

Die Industrie stellt heute kommerzielle Schnelltestreagenzien zur Verfügung, die gegenüber den früher gebräuchlichen gleichbleibendere Versuchsbedingungen garantieren.

Ziff (1,32) endlich weist mit seinem Inhibitionstest durch das Fehlen des Hemmungsfaktors den Rheumafaktor im Patientenserum mittels einer Verdünnungsreihe direkt nach (21), Bunim ersetzte 1950 die Erythrocyten durch Bentonitpartikel (22).

Aus der Zahl der in der Rheumadiagnostik gebräuchlichen serologischen Nachweisreaktionen sei noch die Bestimmung des Antistreptolysintiters (ASL) genannt, die für den akuten Gelenkrheumatismus wertvoll ist und neben der Aktivitätsdiagnose eine differentialdiagnostische Abklärung erlaubt (97). Bei Zugrundelegung des Kopenhagener Standardserums gilt ein Wert über 1:200 als erhöht und als Hinweis dafür, daß der Körper gegen Streptokokkentoxine sensibilisiert ist. Bei der primär chronischen Polyarthritis dagegen fällt der ASL, nach Hartmann und Christ (17,35) immer, nach anderen Autoren (1) meist negativ aus. Mayerhofer und Voill (35) sahen bei der primär chronischen Polyarthritis vorwiegend niedrige Normaltiter, wie 1:100 bis 1:400, in 40% der Fälle fanden sie ein bis zweimal im Titerverlauf Werte von 1:800 oder 1:1600, ähnlich wie Winblad

und Christ (1) es angaben. Markowitz (54) verneint die Frage, ob Rheumatiker mehr Streptokokkeninfekte als andere erlitten haben, folgert er es doch daraus, daß seine Untersuchungen ergaben, daß 65% der Patienten mit akutem rheumatischen Fieber Antikörper gegen einen oder mehrere Typen des Streptokokkus A hatten. Bei gesunden Vergleichspersonen fand er diesen Anteil bei 52%.

METHODIK und eigene VERSUCHE

Versuchsaufbau

Die von Ouchterlony (64) angegebene Methodik ist von uns zwar im wesentlichen bei den Untersuchungen übernommen, doch in einigen Punkten auch abgeändert worden.

Objektträger in den Abmessungen 76 x 26 mm wurden zur besseren Unterscheidung der späteren Präparate mit einem Diamantstift in einer Ecke fortlaufend durchnumeriert und dann mit einem Silikonschwamm und einem handelsüblichen Spülmittel in heißem Wasser durch zweimaliges gründliches Waschen völlig fettfrei gemacht. Nach wiederholtem Spülen in heißem Wasser und abschließend mit aqua bidestillata stellten wir sie in Farbtrögen für mindestens zwei Stunden bei 100°C zum Trocknen in den Brutschrank. Zur Herstellung des Agars wurden 0,75 g Reinagar (Behringwerke für Immunelektrophorese und Gel Diffusionsteste Op. Nr. 17) sowie 0,01 g Cialit (2 Aethylquecksilbermercapto benzoxazol 5 carbonsaures Natrium, Hersteller ASID Institut GmbH München) als Bakterio- und Mykostatikum auf einer analytischen Waage abgewogen und mit 50 cm^3 aqua bidest. versetzt. Alle diese Mengen wurden durch Meßpipetten mit einem Bereich von 100 cm^3 bestimmt. Dieses Gemisch erwärmten wir vorsichtig, ohne es je kochen zu lassen auf einem Bunsenbrenner, bis die Agarflocken zu einer hellen, klaren Flüssigkeit geschmolzen waren. Dann brachten wir zu dieser Lösung 33,2 cm^3 Phosphatpuffer (pH 7,1; 0,15 mol) und 16,6 cm^3 aqua bidest., die beide in einem Erlenmeyerkolben ohne zu kochen erwärmt wurden, und das Gemisch wurde nochmals, wiederum ohne Kochen erwärmt.

Nach anfänglichen Versuchen mit einem Veronalpuffer (1,66; Veronal Natrium 10,51; Calc.lactis 1,536; aqua dest.ad 1000 ml), deren Ergebnisse nicht befriedigten, entschlossen wir uns zum Arbeiten mit obigem Phosphatpuffer. Alle Reagenzien stammten aus der Apotheke der Poliklinik der Universität München.

Die heißen und völlig sauberen Objektträger wurden auf eine ebene Unterlage gebracht, die vorher mit einer Wasserwaage justiert war, um so eine gleichmäßige Verteilung des Agars zu erreichen. Auf jeden Objektträger ließen wir aus einer

Pipette 2 cm^3 des flüssigen Agars laufen, nach Erstarren wurden diese bis zur Verwendung in einer feuchten Kammer aufgehoben, die wir aus 2 cm dicken Glasplatten, in den Abmessungen 17 x 30 cm, die mit einem 2 cm breiten und 3 cm hohen Schaumgummistreifen eingefaßt waren, der häufig mit Wasser benetzt wurde, herstellten.

Durch die gleichmäßige Feuchtigkeit verhinderten wir ein vorzeitiges Austrocknen der Agarträger, was durch ein zugeschnittenes Löschblatt auf dem Boden und an dem Deckglas angelegt, verstärkt wurde.

Wenn wir auch für unsere Versuche stets eine Agarkonzentration von 0,75% benutzten, so untersuchten wir doch auch eventuelle Abhängigkeiten in der Intensität der sich ausbildenden Linien von der Stärke des Agars, konnten aber bei Konzentrationen von 0,5%, 0,75%, 1%, 1,5% und 2% keinen Unterschied feststellen. So wurde die Bemerkung von Wodehouse (107) bestätigt, daß innerhalb der Breite von 0,6% bis 1,5% keine Unterschiede in der Intensität der sich ausbildenden Linien bemerkbar sind. Auch war es ohne Einfluß auf die Ausbildung der Präzipitationslinien, ob die Präparate sofort gegossen wurden, sobald der Agar flüssig war, oder ob wir ihn nach dem Herstellen im Eisschrank erstarren ließen und nach einigen Tagen vor Gebrauch erneut verflüssigten. Ein Strukturwandel, der zu einer Veränderung in der Ausbildung der Linien geführt hätte, konnte von uns nicht beobachtet werden. Die zum Beschicken der Agarträger notwendigen Stanzen stellten uns die Orthopädische Werkstätte der Poliklinik der Universität München her, es sind dieses 3 x 8 cm große Holzblöcke, in die um eine Mittelkanüle angeordnet, fünf 2 cm lange, 5 mm über den Block herausragende Metallkanülen stecken, mit einem Durchmesser von 2 mm lichter Weite, die aus Punktionskanülen zugesägt wurden. Bei der von uns benutzten Stanze betrug der Abstand 4 mm vom Mittelpunkt zum umgebenden Kranz der Kanülen, sowie von jeder Randkanüle zur nächsten. Dadurch war die bei der Diffusion zurückzulegende Strecke stets gleich. Versuchsabwandlungen mit Stanzen von 5 bzw. 3 mm Abstand ergaben, daß die mit 4 mm die klarsten Linienausbildungen lieferte.

Beim Beschicken der Agarplatten wurden 5 dieser Systeme auf jede eingedrückt und die ausgestanzten Mitten der Systeme einzeln mit einer Injektionsnadel Nr.1

und der Wasserstrahlpumpe aus dem Agargel gesaugt. In den Seren, die aus der Rheumaambulanz der Universitäts-Poliklinik München stammten, war der Latex- und der CRP-Wert vorher nach den üblichen Methoden bestimmt worden. Sie standen im Eisschrank bei -20°C eingefroren zur Verfügung. Wir tauten sie höchstens ein bis zweimal auf und brachten sie, um weitere Veränderungen der Eiweißstruktur zu vermeiden, sofort nach Gebrauch wieder dahin zurück.

Die Bayerische Blutbank in München überließ uns freundlicherweise die für den Vergleich notwendigen Normalseren.

Im Reagenzglas wurde eine Verdünnungsreihe von 11 Teilen aqua bidest. und 1 Teil Rheumatikerserum bzw. Normalserum hergestellt. Bei den außerordentlich kleinen Mengen hat sich die Verwendung der doppelten Portionen, d.h. 22 Teile aqua bidest. zu 2 Teilen Serum der größeren Sicherheit wegen bewährt.

Für alle unsere Untersuchungen benutzten wir stets Blutzuckerpipetten herkömmlicher Art. In die ausgestanzten und ausgesaugten Agarlöcher wurde, rechts oben beginnend, entsprechend dem Uhrzeigersinn fortlaufend, in jedes Loch mittels einer Glasmikropipette, die wir uns aus Rohpipetten mit einem Durchmesser von 2 mm auf dem Bunsenbrenner selbst zogen, so viel verdünntes Serum gebracht, bis das Loch gestrichen voll war.

Wir stellten fest, daß beim Gebrauch von Pipetten, deren lang ausgezogene Mikrospitze sich nicht immer ganz gerade abschneiden ließ, das Füllen der Löcher gleichmäßiger erfolgte, wenn wir durch vorsichtiges Blasen das verdünnte Serum in die Löcher trieben, ohne daß es über den Rand stieg.

Um eine Mischung bei dieser Mikromethode zu vermeiden, verwendeten wir für jedes Agarloch eine neue Mikropipette zum Einfüllen und verwarfen sie nach einmaligem Gebrauch.

Danach wurden in das Mischreagenzglas wieder 2 ml aqua bidest. gebracht, zur gleichmäßigen Vermischung geschüttelt, alle an der Pipette außen anhaftenden Wassertropfen mit Zellstoff vorsichtig abgewischt und das folgende Loch gefüllt. Um ein Austrocknen während dieses erheblich zeitraubenden Vorganges zu vermeiden, beließen wir die Agarplatten während des gesamten Füllvorganges in der feuchten

Kammer und deckten mit einer Glasplatte den nicht benutzten Teil ab.

Als wir feststellten, daß im frisch bereiteten und gegossenen Agar gelegentlich noch sehr viel Wasser enthalten ist, saugten wir mit der Wasserstrahlpumpe die gestanzten und von Agarplättchen befreiten Löcher kurz vor dem Füllen nochmals von einsickerndem Wasser ab, um diese unkontrollierte Verdünnung zu vermeiden. In das mittlere Loch wurden die Antiseren von Ziegen, die gegen menschliche α_2- und β_2-Makroglobuline sensibilisiert waren, mit einer Mikropipette gebracht.

Wir verwandten bei unseren Versuchen amerikanische Antiseren der Hyland Laboratories Los Angeles, nachdem das deutsche Kaninchen-Anti-Humanserum der Behringwerke Marburg für β_2-Makroglobulin nicht rein genug war.

Nun diffundierte das innen gelegene Antigen gegen das von außen nach innen durch den Agar diffundierende Rheumatiker- bzw. Normalserum und es bildeten sich an der Stelle, wo optimale Verhältnisse vorlagen, die Präzipitationslinien aus (67). Die feuchten Kammern mit den Präparaten wurden nach Beschicken der Löcher in den Brutschrank gebracht, wo sie bei der konstanten Temperatur von 37°C unter wiederholtem Benetzen der Schaumgummieinfassungen 72 Stunden verblieben. In dieser Zeit haben sich unserer Erfahrung nach die Präzipitationslinien endgültig und am deutlichsten ausgebildet. Die Präparate wurden danach für 24 Stunden vorsichtig in eine physiologische Kochsalzlösung gegeben, in der die überschüssigen Proteine, die mit den Antikörpern nicht reagiert hatten, herausgeschwemmt wurden.

Während sie hier auf einer von uns gezogenen Bank aus Glasstäben lagen, war jedes Bewegen der Kochsalzwanne zu vermeiden, weil die in Bewegung geratene Flüssigkeit sich leicht zwischen Glasplatte und Agarschicht schiebt und diese abhebt, so daß sie frei umherschwimmt und beim Vorhandensein vieler Präparate verwechselt und nicht mehr ausgewertet werden kann. Je heißer der Agarträger beim Gießen ist, desto fester haftet das Gel darauf.

Danach liegt der Agarträger 6 Stunden bei 37°C im Brutschrank mit Filterpapier bedeckt, um so ein gleichmäßiges Trocknen unter Vermeidung von Rissen im Agar

zu erreichen. Es bleibt schließlich eine hauchdünne, dem Glas fest aufliegende Agarschicht zurück. Nach fünf Minuten Verweilen in 5%iger Essigsäure werden die Präparate für 48 Stunden in einen Färbetrog mit Amidoschwarzlösung (Amidoschwarz 10 B 1,0; Acetatpuffer 850 ml; Glycerin 150 ml) gebracht, wobei sich zwar das ganze Präparat dunkelblau, die Präzipitationslinien aber besonders stark anfärben. Danach kam das Präparat für 1/2 Stunde in den Entfärber (Essigsäure 2% 850 ml; Glycerin p.a. 150 ml), der die übrige Blaufärbung mit Ausnahme der Präzipitationslinien weitgehend rückgängig machte. Unsere Versuche, wie Färben mit Karminrot bzw. Änderung der Färbedauer mit Amidoschwarz führten zu keinen verbesserten Ergebnissen.

Da die scharf begrenzte Präzipitationslinie bei starker Verdünnung als eine helle, im dunkleren Feld ausgesparte Linie abgelesen werden kann, darf das Präparat nur kurz im Entfärber liegen, um diese Vergleichsmöglichkeit mit der Umgebung zu erhalten. Nach gründlichem Waschen mit Leitungswasser und anschließendem Trocknen ist das Auswerten der Grenze möglich.

Diese Grenze, als die bei stärkster Verdünnung noch sichtbare Präzipitationslinie, wurde mit bloßem Auge und bei direktem Licht abgelesen, die photographische Aufnahme erwies sich als dem Auge unterlegen.

Nach anfänglichen Experimenten mit einer geometrischen Verdünnungsreihe benutzten wir zur genauen Festlegung der tatsächlich zuletzt erkennbaren Präzipitationsgrenze eine Versuchsreihe mit schrittweise steigender Verdünnung 1:11, 1:12 etc. Ferner ließen wir sie weit vor dem nach unserer Erfahrung zu erwartenden Grenzwert beginnen und erst in einem Bereich enden, wo sicher keine Präzipitation mehr stattfindet, um so eventuell ausscherende Ergebnisse mit dieser umfangreichen Skala aufzufangen.

Sie umfaßte bei den Versuchen mit α_2-Makroglobulin, für das wir einen Durchschnittswert von 60 erhielten, eine Verdünnungsreihe von 1:11 bis 1:85, bei β_{2M} mit einem gefundenen Durchschnittswert von 50 1:11 bis 1:60, während die Normalseren bei der gleichen Skala Werte von 45 bzw. 23 für β_{2M} erbrachten.

Die Versuchsbedingungen wie Herstellung des Agars, Aufbewahren der Seren und Präparate, Art der Beschickung und Färbung waren stets gleichbleibend, so daß Schwankungen bei den speziellen Ergebnissen, also auch bei den Normalseren, keine Artefakte sein dürften, sondern Variationsbreiten, wie wir sie in der Natur der Dinge erwarten müssen.

Wir haben als Beispiel je eine Verdünnungsreihe von α_2- und β_2-Makroglobulinen und Normal- und Rheumatikerseren mit einem Latexwert +, ++ und +++ fotografieren lassen, um die Intensitätsabnahme der Präzipitationslinien im Uhrzeigersinn bei starken Verdünnungen zu verdeutlichen.

Material

Es wurden in zahlreichen Versuchen von uns insgesamt 70 Seren untersucht. Unter diesen waren 34 Personen ohne jegliche Beschwerden (Blutspender) und 36 aus der Rheumatikerambulanz der Universitäts-Poliklinik München mit unterschiedlichen Aktivitätswerten des Rheumafaktors, die im Latextropfentest bestimmt wurden, und zwar

2 mit Latex ø
9 mit Latex +
5 mit Latex ++
20 mit Latex +++

Aus technischen Gründen wurden bei 28 Normalseren sowohl der Wert für α_2- und β_2-Makroglobulin ermittelt, bei 6 weiteren aber lediglich der für β_{2M}. Die Seren untersuchten wir in einer Verdünnungsreihe von 1:11 bis 1:60 bei β_2-Makroglobulinen und 1:11 bis 1:85 bei α_2-Makroglobulinen unter Verwendung von Antiseren aus den Hyland Laboratories Los Angeles. Die Ablesung erfolgte makroskopisch.

Der Krankengeschichte entnahmen wir die Angaben über Alter, Krankheitsbeginn, Schweregrad und die von der Krankheit befallenen Organe. Da es sich um überwiegend ambulante Patienten handelte, haben wir keinen einzigen selbst

untersucht, sondern die in der Sprechstunde erhobenen Anamnesen ausgewertet. Die Patienten gaben auch den Beginn der Krankheit selbst an, so daß wir ihm mit der gewissen Skepsis gegenübertreten werden, die alle derartigen subjektiven Angaben erfordern. Bei der in Schüben verlaufenden primär chronischen Polyarthritis ist diese ja für die Beurteilung eines Falles von informatorischer Wichtigkeit.

Gewisse Schwierigkeiten bereitete uns die Einteilung der Patienten nach dem Schweregrad ihrer Erkrankung.

Wir finden in der Literatur verschiedene Vorschläge dazu, so z.B. die Stadieneinteilung in 5 Grade von Tichy (111). Schuler (89) berichtet von den Bemühungen der amerikanischen Rheumagesellschaft, die sich auf die Vorarbeiten von Ropes und seiner Mitarbeiter stützend, die primär chronische Polyarthritis in ein einfaches und für eine therapeutische Prüfung vergleichbares Schema gießen wollte. So wurde eine Liste der 11 bei der p.c.P. am häufigsten auftretenden Symptome erstellt; bei Vorhandensein von 7 derselben gilt sie als klassisch, bei 5 als sicher, bei 3 dieser aufgeführten Kriterien als wahrscheinlich vorhanden. Lansbury (89) führte diesen Weg der Objektivier- und Vergleichsbarkeit weiter, als er Indexzahlen erarbeitete, die die Dauer der morgendlichen Steifigkeit ebenso wie das Intervall bis zum Eintritt der Erniedrigung der BKS und andere Angaben umfaßte. Taube (96) schlüsselte seine Tabellen nach Berufen auf und suchte weiterhin nach verdächtigen Herden, wie Tonsillen, Gebiß etc. Cleve (18) endlich empfiehlt, zusätzlich Angaben über die Temperatur und die Zahl der Leukocyten zu machen.

Da wir, wie schon erwähnt, selbst keine Untersuchungen vornehmen konnten, verwandten wir bei der Klassifizierung des Schweregrades das von Steinbrocker angegebene Schema (95) und konnten weder das von Hittmaier und Günther (41) noch das detailliertere von Günther (31) vorgeschlagene verwenden, doch halten wir die nachfolgende klare und übersichtliche Einteilung durchaus für unsere Überlegungen geeignet.

I. Stad. Frühstadium: Rö. keine destruktive Veränderungen; leichte Osteoporosis kann vorhanden sein.

II. mittelschweres Stadium: Keine Gelenkdeformierung, obwohl Behinderung der Gelenkbeweglichkeit möglich ist. Atrophie der gelenknahen Muskulatur, Osteoporosis mit oder ohne leicht subchondrale Knochenveränderung. Geringe kartilaginäre Destruktion, Knötchen oder Tendovaginitis können vorhanden sein.

III. schweres Stadium: Rö. kartilaginäre und Knochendestruktion zusammen mit Osteoporosis, Gelenkdeformierung, Subluxation, ulnare Devination, Hyperextension, ohne knöcherne oder fibröse Ankylosis, starke Muskelatrophie, Knötchen, Tendovaginitis können vorhanden sein.

IV. Endstadium: Fibröse oder knöcherne Ankylosen, übrige Kriterien wie Stadium III.

Wir fanden bei unseren Patienten:

zum Stadium I	zählend	5
zum Stadium II	zählend	16
zum Stadium III	zählend	11
zum Stadium IV	zählend	2
		34

Bei 2 Überweisungspatienten war die Krankengeschichte nicht aufzufinden oder ließ durch mangelhafte Angaben keine exakte Einteilung zu.

Sehr viel aufschlußreicher sind die Werte, die im Labor ermittelt wurden, wie die für den Latex, das CRP und die BKS, das Datum der Serumabnahme und, soweit feststellbar, auch das der anderen Werte. Die Elektrophorese wurde nicht in allen Fällen durchgeführt. Eine zeitliche Übereinstimmung in der Bestimmung der Elektrophorese und der BKS-Werte ließ sich aus technischen Gründen nur in 8 Fällen feststellen, wobei die zeitliche Konkordanz, die in der letzten Spalte der Tabelle mit "positiv" vermerkt ist, dann als gegeben betrachtet wurde, wenn die drei oben genannten Bestimmungen innerhalb eines Zeitraumes von 30 Tagen gemacht worden waren.

Die Latex- und CRP-Werte wurden in der Rheumaambulanz der Universitäts-Poli-

klinik München nach den bekannten Versuchsanordnungen von Singer und Plotz gewonnen.

Die Bestimmung des CRP, das ja einen Rückschluß auf die Aktivität der Krankheit zuläßt, ergab:

11	ø
10	+
10	++
4	+++
1	++++
36	

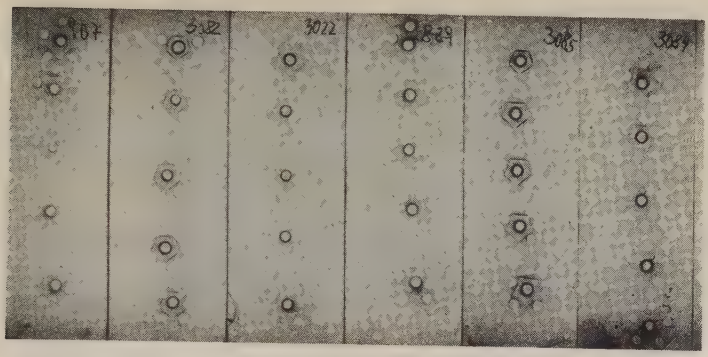
Die Beurteilung der Elektrophoresewerte unter der speziellen Fragestellung der p.c.P. ist kritisch, gehen doch die Meinungen darüber auseinander, ob lediglich die Vermehrung der γ-Globuline bei der Polyarthritis auffallend ist oder mehr dem Quotienten γ Glob./Alb. Bedeutung zukommt (50).

Wir meinen wohl, in einigen Fällen eine deutliche Vermehrung der γ-Globuline feststellen zu können.

Diese Frage ließen wir durch eine mathematisch statistische Auswertung absichern, die Herr W.J. Ziegler (Zürich) liebenswürdigerweise für uns besorgte. Er ging an Hand unserer Versuchsergebnisse davon aus, daß mit steigenden Latexwerten im Vergleich zu Normalseren in Rheumatikerseren die Sichtbarkeit einer Präzipitationslinie gegen α_2- und β_2-Makroglobuline auch bei erheblich stärkeren Verdünnungen noch nachweisbar ist.

Name	Krankenblatt No.	Alter	Krankh. Beginn	Schwere-grad	Befallene Gelenke	Datum d. Serumabnahme	Latex Datum	Latex Wert	CRP Datum	CRP Wert	BKS Datum	BKS Wert	Elektrophorese Datum	Elektrophorese Wert	Diagnose	Zeitl. Übereinst. Serumabnahme und El. Phorese
1. Bauer Johann	P5320/61	64 J.	1957	II	Alle Gelenke	6.V.1963	22.V.63	+++		+++	6.V.63	32/64				
2. Bauernschmidt Bertha	02372/63P	71 J.	1960	II	li.Knie, L.W.S.		16.V.63	+++		∅	16.V.63	8/20	22.V.1963	a_1 5,2; a_2 14,7; ß 17,6; ¡ 14,5	C.P.	Pos.
3. Baum Maria	01260/63P	66 J.	1961	I	Schulter, Hüfte, Knie schmerzhaft	4.III.1963	4.III.63	+++		+	4.III.63	9/26	17.V.1963	a_1 4,9; a_2 9,8; ß 12,8; ¡ 20,9	C.P.ohne Arthr. Osteochondr.WS	
4. Baumeister Katharina	0419/63P	55 J.	1958	II	Handgelenke, Finger, Knie, Ellbg. verd.			+		++++		81/109		a_1 4,6; a_2 9,9; (hämolyt) ¡ 16,6	C.P.Spondylose Knie Arth.def.	Pos.
5. Decker Christine	02770/63P	55 J.	1954	II	Handgelenke, Finger, Knie, HWS	2.VII.1963		+		+				a_1 7,4; a_2 8,0; ß 16,8; ¡ 27,3	C.P.	
6. Eder Marianne	5766/59	26 J.	1954	IV	Hüfte, Hände, Finger starke Bew.Einschr.			+++		+++		30/69			Arth. def.	
7. Eggensberger Rosalie	03310/63P	55 J.	1959	II	Knie schmerzhaft Finger, Bew.Einschr.	24.VI.1963	2.VI.63	++		+	21.VI.63	25/55			C.P. destr.	
8. Esslinger Robert	04391/63K	62 J.	1940	III	Schulter, r.Ellbg. r.Sprungg., li.Hand	30.VII.1963		+++		++	30.VII.63	135/148	24.VI.1963	a_1 5,3; a_2 10,2; ß 11,7; ¡ 24,8	C.P.	Pos.
9. Fehlner Johann	04018/63P	76 J.	1962	II	li.Arm Schmerz Rö. kein Befund			+		+		2/5	30.VII.63	a_1 7,4; a_2 14,4; ß 13,4; ¡ 26,4	C.P.destr.	Pos.
10. Fisch Franz	03182/63P	57 J.	1946	III	Handgel. re. Knie li.Sprungg.			+++		++		26/56			Spondyl.Arthr. Osteochondr.CP	
11. Fischer Hugo	P3660/61	56 J.	1945	III	Kniegel. Fingergel.			+++		++		62/162		a_1 6,5; a_2 10,7; ß 12,6; ¡ 19,9	C.P.	
12. Grün Else	03212/63P	68 J.	1959	II	Arthr. li. Knie			++		+		22/49			C.P.	
13. Hofner Meta	03497/63K	62 J.	1956	II	li.Schulter, Handgel. Finger, Knie, Hüfte	27.VI.1963	27.VI.63	+		∅	27.VI.63	7/21		a_1 5,7; a_2 10,3; ß 10,5; ¡ 27,0	C.P.	
14. Huber Therese	P4429/62	74 J.	1945	IV	Hand, Fuß, Schulter kann nicht mehr gehen	24.X.1962		+++		++		40/57	22.VI.63	a_1 4,9; a_2 8,2; ß 12,5; ¡ 16,9	C.P. ohne Osteochondr.	Pos.
15. Kasparbauer Fritz	P1525/61	62 J.	1949	III	re. Knie Schwellg. Handgelenk			+++		++		17/45	31.VII.63	a_1 6,5; a_2 12,8; ß 12,6; ¡ 22,3	C.P.	
16. Kassekart Hubert	00891/63P	56 J.	1950	II	li.Knie u. rechts keine Schwellung	14.II.1963	13.II.63	++	5.III.63	∅	13.II.63	20/40		a_1 5,0; a_2 9,7; ß 11,1; ¡ 20,2	C.P. destr.	
17. Kinne Hedwig	01703/63P	65 J.	1955	II	Hand, Finger, Knie	18.VI.1963	18.VI.63	+++	18.VI.63	+++	18.VI.63	7/23	5.III.1963	a_1 6,3; a_2 7,5; ß 10,5; ¡ 19,6	C.P.und Arthr.WS	Pos.
18. Kirmeier Lorenz	6706/61	54 J.	1960	III	beide Hände befall.			++		∅		8/23	1.IV.1963	a_1 6,2; a_2 11,2; ß 11,7; ¡ 30,5	C.P. destr.	
19. Klingel Hans	03571/63P	39 J.	1953	III	alle Gelenke Knie versteift			+++		+		17/38		a_1 6,1; a_2 9,7; ß 12,6; ¡ 20,8	C.P.	
20. Lampersbach Auguste	P424/62	63 J.	1962	I	Schmerz i.Ellbg.li.			+++		++	7.V.63	13/33		a_1 6,8; a_2 9,1; ß 12,9; ¡ 15,1	C.P. destr.	
21. Lompersbach Margret	424/62					19.VI.1963		+++		++			19.VI.63	a_1 5,4; a_2 7,9; ß 10,4; ¡ 22,7	C.P.	
22. Lorenz Josefine	02962/63P	72 J.	1959	II	Fingergel.schmerzh. Bew. frei			∅		∅		15/40				
23. Nar Wilhelmine	02408/63P	54 J.	1962	II	re.Knöchel, Finger Handgel.	25.VI.1963	25.VI.1963	+	25.VI.63	∅	25.VI.63	10/29		a_1 5, 6 a_2 9,2; ß 14,8; ¡ 13,2	C.P.app.	
															C.P.	

Name	Krankenblatt No.	Alter	Krankh. Beginn	Schwere-grad	Befallene Gelenke	Datum d. Serumabnahme	Latex Datum	Latex Wert	CRP Datum	CRP Wert	BKS Datum	BKS Wert	Elektrophorese Datum	Elektrophorese Wert	Diagnose	Zeitl. Übereinst. Serumabnahme und El. Phorese
24. Perzl Johann	03268/63K	50 J.	1947	III	Beweg. Einschr. Rö. Veränderung			+++		+		50/90		a_1 17,8; a_2 11,8; ß 13,2; ¡ 23,5	C.P.destr.	
25. Pflücke Anita	02349/63K	36 J.	1963	I	Schwellung li. Schultergelenk		20.VI.63	+	20.VI.63	+	7.V.63	13/33	19.VI.63	a_1 5,4; a_2 7,9; ß 10,4; ¡ 22,7	Ulcus duod.	
26. Raupp Lilly	K4233/62	67 J.	1961	II	Zehen Handgel. Sprunggel.			+++		+		39/71		a_1 6,5; a_2 12.8; ß 12,0; ¡ 22,7	C.P.	
27. Reitmeier Angelika	K4164/62	60 J.	1959	III	Alle Gelenke bef. Deformationen			+++		ø		14/31		a_1 6,8; a_2 11,2; ß 14,1; ¡ 20,2	C.P. destr.	
28. Schefbauer Helga	01969/63P	21 J.	1957	III	Versteif. Hand, Fuß, Ellbg. Schmerzen li. Knie, re. Arm Hüfte	18.VI.1963	18.VI.63	++	18.VI.63	++		20/48		a_1 5,8; a_2 9,8; ß 12,5; ¡ 20,7	C.P.	
29. Schneidemeier Georg	02779/63P	79 J.	1952	II	Knie, Arm schmerzh.	21.III.1963		+++		+		3/8		a_1 16,1; a_2 9,1; ß 10,8; ¡ 21,7	C.P. destr. orthop. Proth. beschw.	
30. Schwann Hans	1851/63	52 J.	1963	I	Handgelenk Bew. Einschr.	21.V.1963		+++		++					C.P. destr.	
31. Schwirgotzky Horst	04118/63P	41 J.	1959	III	Alle Gelenke	11.III.1963		+++		++		20/48				
32. Schramm Ursula	Wi.	27 J.	1961	-	-	26.III.1963		ø		ø					Gicht	
33. Seebold Elisabeth	04032/63K			I		14.VI.1963		+		ø						
34. Thomaschek Peter	P3451/62	67 J.	1963	II	Schulter, Sprungg. Bew. Einschr.	12.II.1963	18.I.63	+		ø		11/31	12.II.63	a_1 6,2; a_2 9,5; ß 11,7; ¡ 17,4	C.P.	Pos.
35. Trautmann Anna	03709/63P	50 J.	1946	III	Schulter, Finger, Knie Bew. Einschr. Handgl. deformiert		31.V.63	+++		ø	31.V.63	16/40	31.V.63	a_1 5,2; a_2 11,8; ß 13,0; ¡ 14,5	C.P.destr. Osteoporose	
36. Wimmer Maria	03113/63K	64 J.	1963	II	Knie, Finger schmerzh. Knötchenbildung	19.VI.1963	14.VI.63	+	14.VI.63	+++	14.VI.63	7/21	21.VI.63	a_1 5,4; a_2 7,1; ß 12,2; ¡ 14,0	C.P.	Pos.

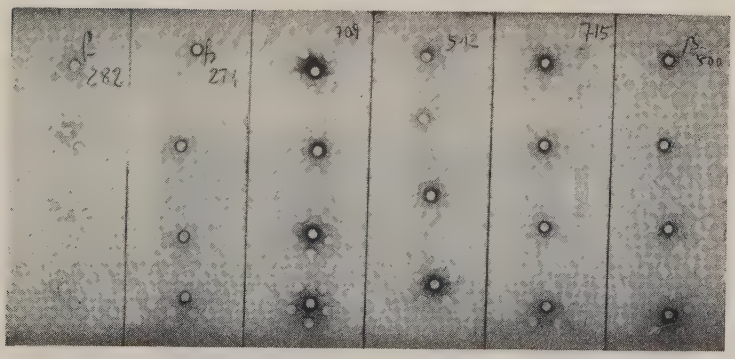


β_{2M} 11-35 α_2 11-35 α_2 36-60 β_{2M} 11-35 α_2 11-35 α_2 36-60

H 23 H 26

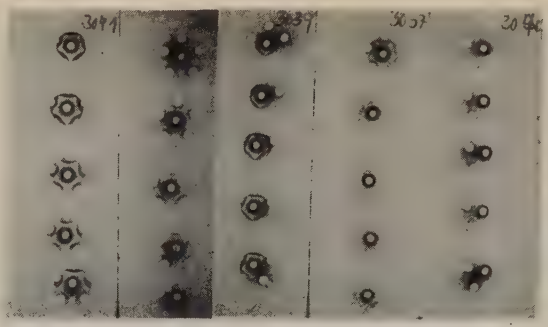
Normalseren

Die Verdünnungen nehmen im Uhrzeigersinn ab



β_{2M} 11-35 α_2 11-35 β_{2M} 11-35 β_{2M} 36-60 α_2 11-35 α_2 36-60

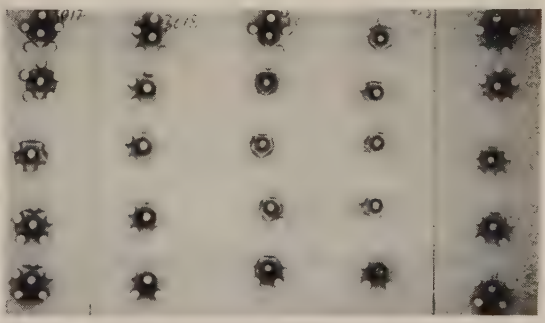
N 9 N 11 N 14



β_{2M} 11-35 β_{2M} 36-60 α_2 11-35 α_2 36-60 α_2 61-85

Latex +

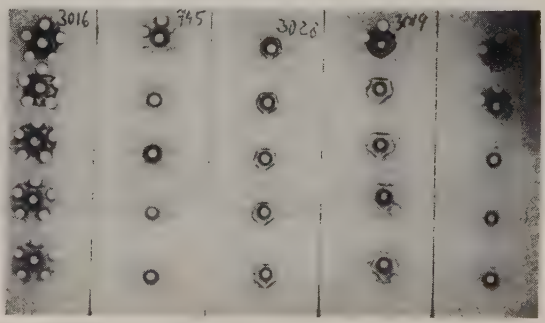
Pflücke, Anita



β_{2M} 11-35 β_{2M} 36-60 α_2 11-35 α_2 36-60 α_2 61-85

Latex ++

Grün, Else



β_{2M} 11-35 β_{2M} 36-60 α_2 11-35 α_2 36-60 α_2 61-85

Latex +++

Trautmann, Anna

Meßergebnisse

Tabelle 1

Werte für d_2 bei Normalseren

Zahl der untersuchten Seren: 28

No. des Präparates	No.d. Normalserums	Grenze d.Verdünnungsreihe
828	N 16	51
711	N 12	37
715	N 14	37
704	N 17	19
ß 271	N 11	20
ß 268	N 7	19
ß 276	N 6	20
ß 254	N 43	26
ß 213	N 42	26
ß 229	N 41	26
925	N 18	51
966	N 19	35
933	N 21	60
703	N 15	49
3056	H 13	60
3059	H 30	58
3054	H 27	58
993	H 5	53
3074	H 35	59
1052	H 18	56
3073	H 7	60
3079	H 1	55
3053	H 4	56
3084	H 26	56
839	H 14	60
3022	H 23	60
3061	H 20	56
3092	H 48	60

Meßergebnisse

Tabelle 2

Werte für $ß_{2M}$ bei Normalseren

Zahl der untersuchen Seren: 34

No. des Präparates	No. d. Normalserums	Grenze d. Verdünnungsreihe
813	N 16	21
535	N 15	21
ß 224	N 34	21
ß 225	N 32	24
ß 66	N 31	24
ß 221	N 30	21
ß 268	N 12	26
520	N 13	36
709	N 14	26
ß 287	N 10	20
ß 282	N 9	13
ß 288	N 8	21
ß 290	N 6	22
ß 208	N 43	21
ß 211	N 42	19
ß 250	N 40	20
930	N 18	32
824	N 17	20
902	N 19	20
535	N 15	35
1001	N 21	55
3056	H 13	35
1010	H 30	34
3057	H 18	31
3055	H 27	35
3051	H 5	35
986	H 35	34
3072	H 4	36
908	H 7	31
3080	H 1	35
829	H 26	31

No. des Präparates	No. d. Normalserums	Grenze d. Verdünnungsreihe
3046	H 14	36
907	H 23	31
3023	H 48	35

Meßergebnisse

Tabelle 3

Werte für α_2 und β_{2M} bei Latex Ø

Zahl der untersuchten Seren: 2

N a m e	No. des Präparates		Grenze d. Verdünnungsreihe α_2	β_{2M}
1. Lorenz, Josefine	3071	-	54	?
2. Schramm, Martha	991	3014	60	36

Tabelle 4

Werte für α_2 und β_{2M} bei Latex +

Zahl der untersuchten Seren: 9

N a m e	No. des Präparates		Grenze d. Verdünnungsreihe α_2	β_{2M}
1. Baumeister, Kathar.	834	934	60	45
2. Decker, Christine	939	970	66	45
3. Fehlner, Joh.	981	926	41	30
4. Hofner, Meta	960	969	32	21
5. Nar, Wilhelmine	820	817	50	32
6. Pflücke, Anita	3040	3042	62	51
7. Seebold, Elisab.	805	808	80	55
8. Thomaschek, Peter	ß 291	551	42	28
9. Wimmer, Maria	803	707	61	34

Meßergebnisse

Tabelle 5

Werte für α_2 und β_{2M} bei Latex ++

Zahl der untersuchten Seren: 5

N a m e	No. des Präparates		Grenze d. Verdünnungsreihe α_2	β_{2M}
1. Eggensberger, Rosalie	823	822	76	29
2. Grün, Else	3009	3018	81	60
3. Kassekart, Hubert	836	1011	65	31
4. Kirmeier, Lorenz	1054	1058	82	26
5. Schefbauer, Helga	831	2	52	39

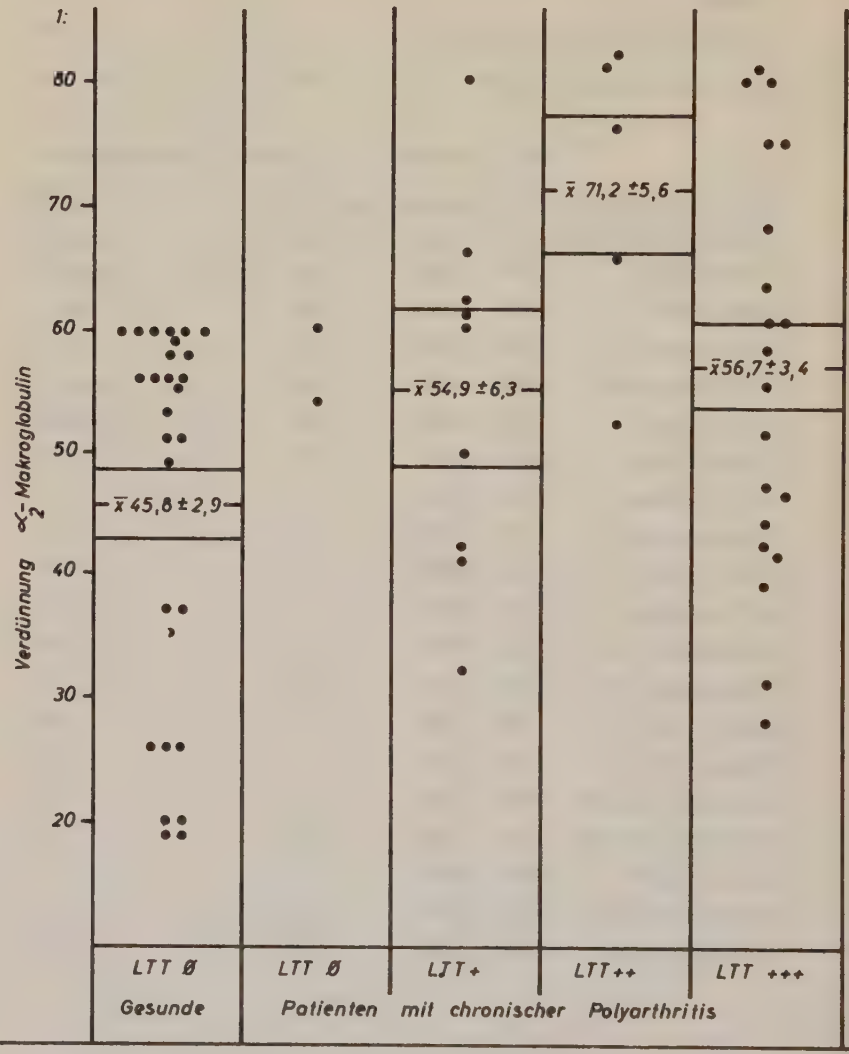
Meßergebnisse

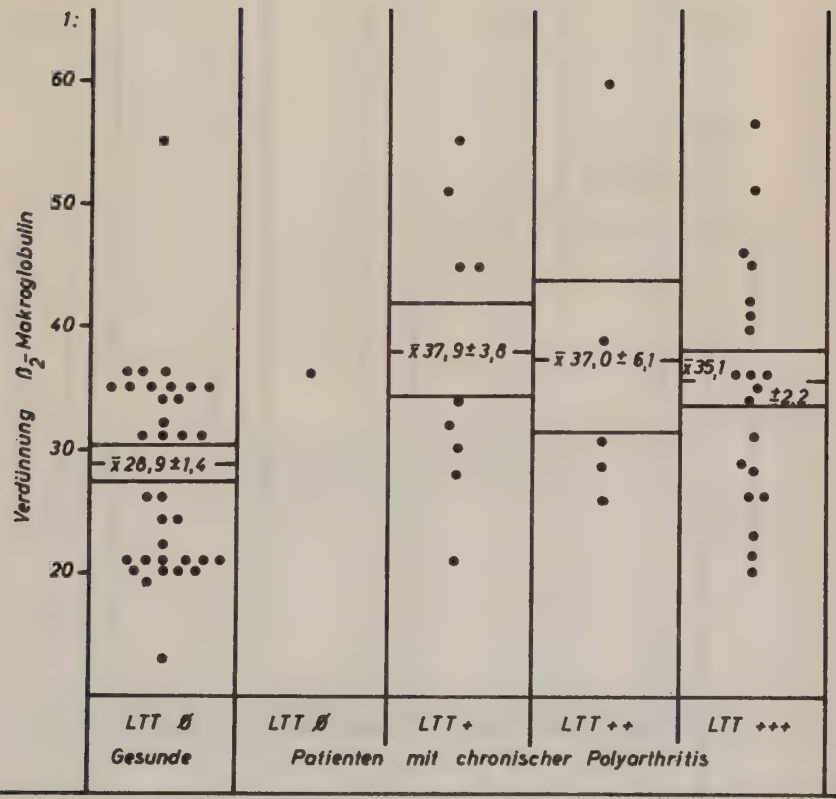
Tabelle 6

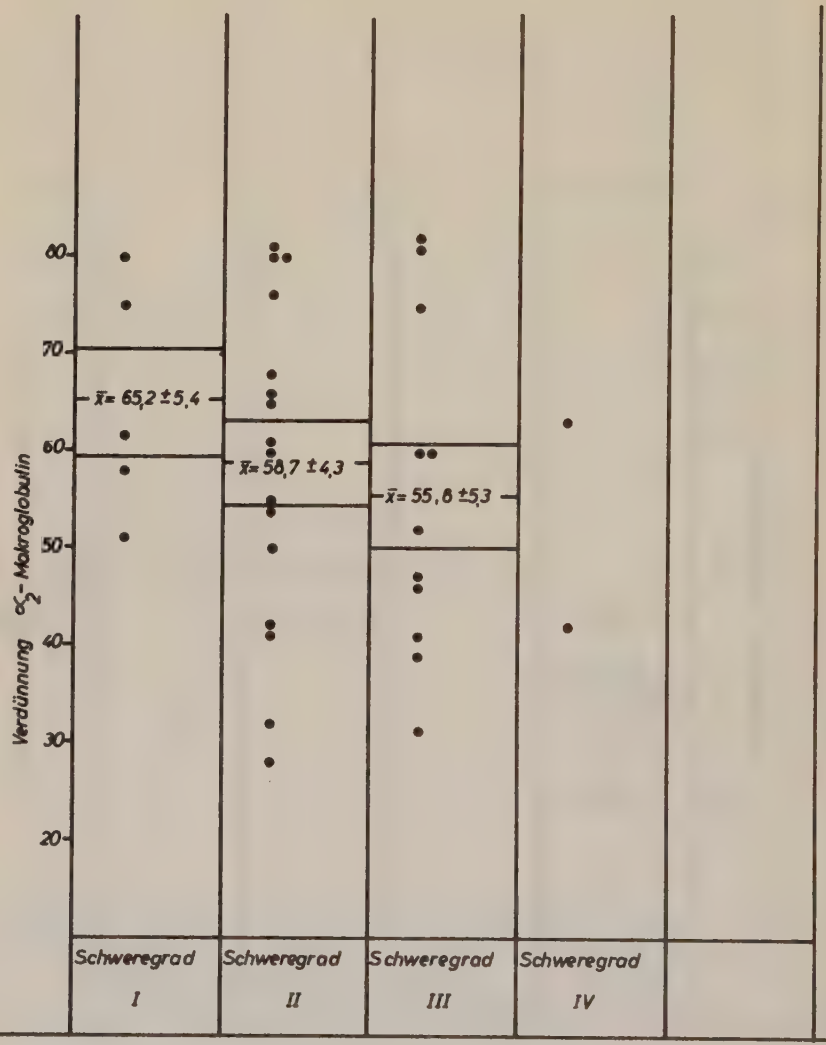
Werte für α_2 und β_{2M} bei Latex +++

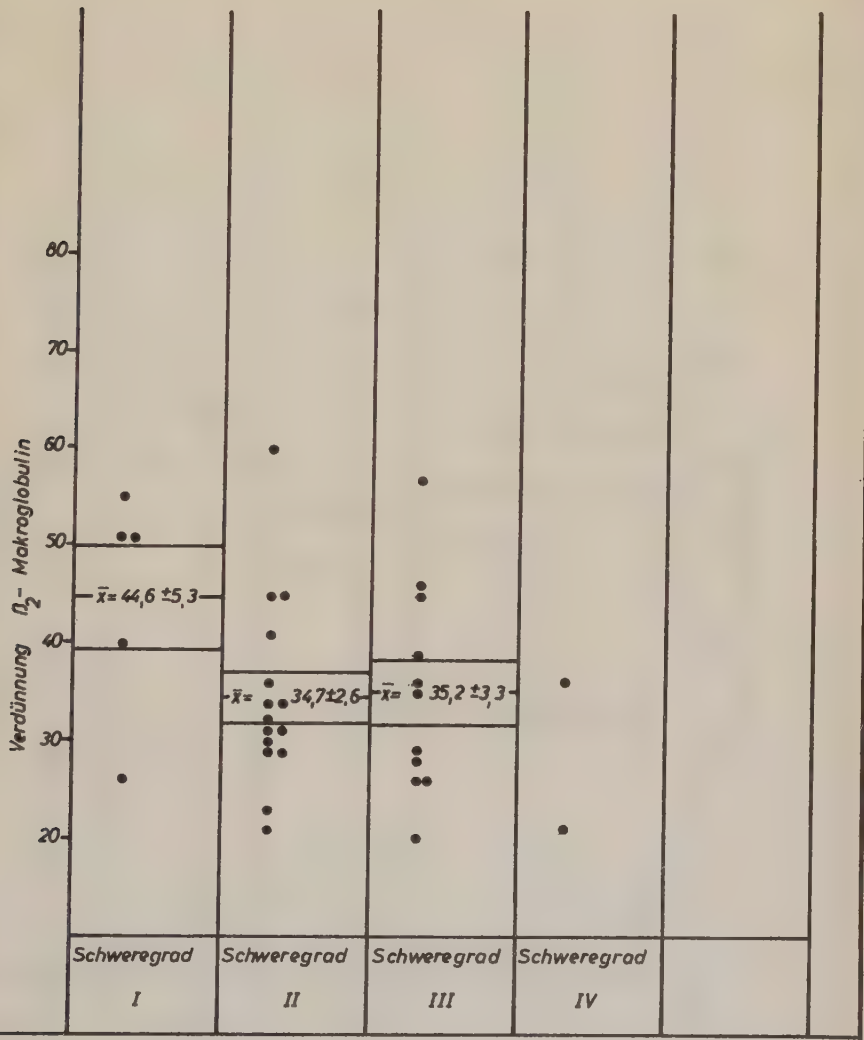
Zahl der untersuchten Seren: 20

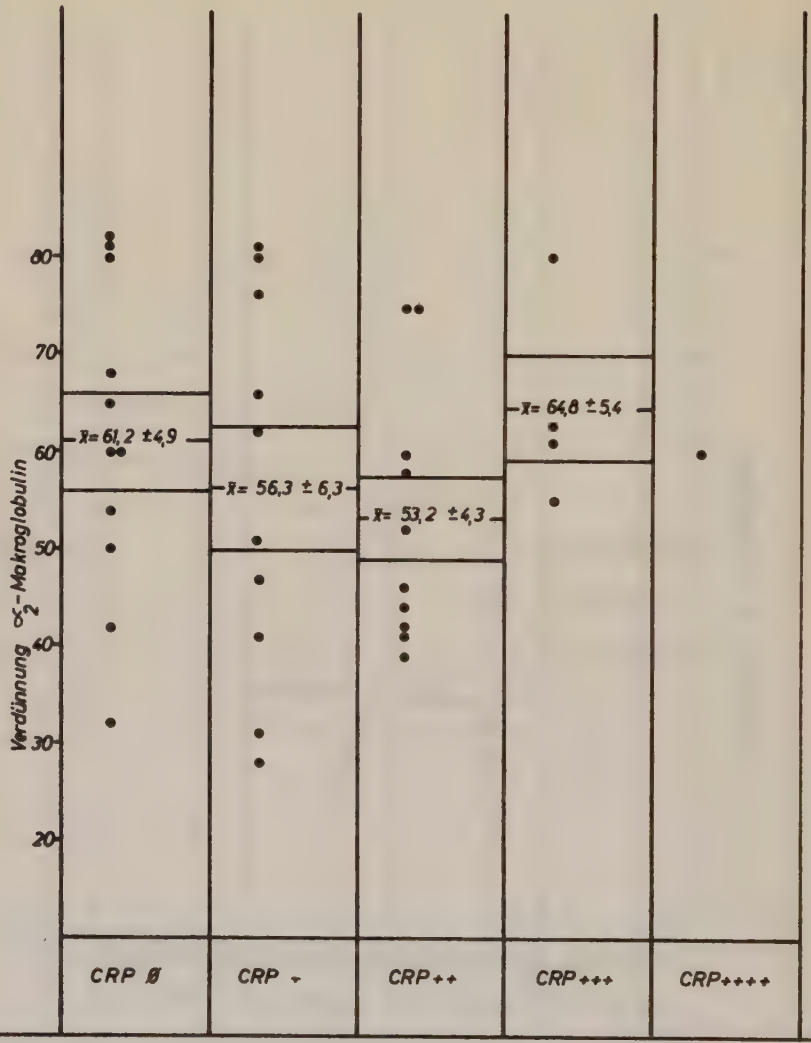
N a m e	No. d. Präparates		Grenze d. Verdünnungsreihe α_2	β_{2M}
1. Bauernschmidt, Berta	537	552	68	41
2. Bauer, Johann	999	998	55	34
3. Baum, Maria	3002	915	51	26
4. Eder, Marianne	534	514	63	36
5. Esslinger, Robert	858	1023	60	36
6. Fisch, Franz	957	840	39	20
7. Fischer, Hugo	3015	3012	75	45
8. Huber, Therese	947	942	42	21
9. Kasparbauer, Fritz	531	545	41	28
10. Kinne, Hedwig	507	ß 292	80	36
11. Klingel, Hans	986	1024	47	35
12. Lampersbach, Aug.	3044	3060	58	40
13. Lompersbach, Marg.	809	807	44	42
14. Perzl, Johann	842	859	31	29
15. Raupp, Lilly	964	994	28	23
16. Reitmaier, Angelika	1017	825	60	26
17. Schneidemeier, Gg.	988	956	80	31
18. Schwann, Hans	3062	3010	75	51
19. Schwirgotzky, Horst	3032	3029	46	46
20. Trautmann, Anna	983	945	81	57

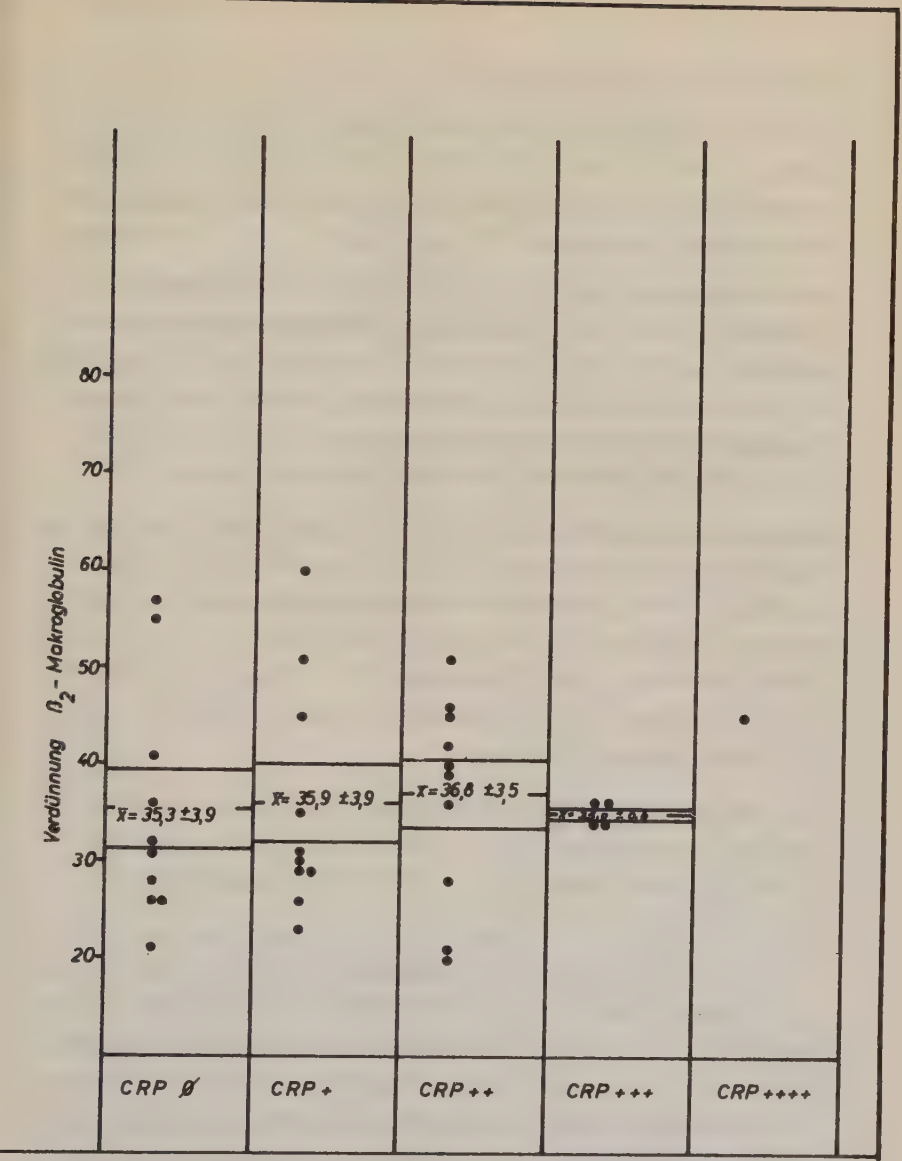

1:
80
70
60
50
40
30
20
Verdünnung α2-Makroglobulin
x̄ 45,8 ± 2,9
x̄ 54,9 ± 6,3
x̄ 71,2 ± 5,6
x̄ 56,7 ± 3,4
LTT Ø
LTT Ø
LTT +
LTT ++
LTT +++
Gesunde
Patienten mit chronischer Polyarthritis


1:
60
50
40
30
20
Verdünnung α_2-Makroglobulin
x̄ 28,9 ± 1,4
x̄ 37,9 ± 3,8
x̄ 37,0 ± 6,1
x̄ 35,1
± 2,2
LTT Ø
Gesunde
LTT Ø
LTT +
LTT ++
LTT +++
Patienten mit chronischer Polyarthritis


Verdünnung α_2-Makroglobulin
80
70
60
50
40
30
20
$\bar{x}$= 65,2 ±5,4
$\bar{x}$= 58,7 ±4,3
$\bar{x}$= 55,6 ±5,3
Schweregrad I
Schweregrad II
Schweregrad III
Schweregrad IV


Verdünnung α2 - Makroglobulin
80
70
60
50
40
30
20
x̄ = 44,6 ±5,3
x̄ = 34,7±2,6
x̄ = 35,2 ±3,3
Schweregrad I
Schweregrad II
Schweregrad III
Schweregrad IV


Verdünnung α_2-Makroglobulin
80
70
60
50
40
30
20
x̄= 61,2 ±4,9
x̄= 56,3 ± 6,3
x̄= 53,2 ±4,3
x̄= 64,8 ±5,4
CRP Ø
CRP +
CRP++
CRP+++
CRP++++


Verdünnung α2 - Makroglobulin
80
70
60
50
40
30
20
X= 35,3 ±3,9
X= 35,9 ±3,9
X= 36,6 ±3,5
CRP Ø
CRP +
CRP ++
CRP +++
CRP ++++

Mathematisch statistische Auswertung

Die Sichtbarkeitsgrenze der Präzipitationslinie gegen $alpha_2$- und $beta_{2M}$-Globulin verändert sich bei Seren von Polyarthritikern gegenüber Gesunden mit steigenden Latex-Werten als Ausdruck der Schwere ihrer Erkrankung. Diese Veränderung ist durch Angabe der Verdünnungsverhältnisse zu erfassen.

Die mathematisch statistische Auswertung stellt diese zahlenmäßig erfaßten Veränderungen dar und sichert ihre Unterschiede anhand mehrfacher Beobachtungen nach wahrscheinlichkeitstheoretischen Überlegungen. Insbesondere stellt sich die Frage, ob allenfalls deutliche Unterschiede pathologischer gegenüber normaler Verhältnisse in direktem Zusammenhang mit den beobachteten Latexwerten stehen und in welchem Maße $alpha_2$- und $beta_{2M}$-Globulinveränderungen korrelieren.

Die zugrundeliegenden Beobachtungsreihen werden zunächst durch die statistischen Maßzahlen beschrieben: Mittelwert $\bar{x}$ und mittlere quadratische Abweichung (m.q.A.) $s_{\bar{x}}$. Für den theoretischen Mittelwert, den Erwartungswert der Grundgesamtheit, läßt sich mit Hilfe von beobachtetem Mittelwert $\bar{x}$ und mittlerer quadratischer Abweichung $s_{\bar{x}}$ ein Vertrauensintervall $\bar{x} \pm v$ angeben, das in Abhängigkeit von der Anzahl der Beobachtungen mit der Wahrscheinlichkeit w (w = 95%) den erwarteten Mittelwert einschließt.

Der Unterschied zweier beobachteter Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ seien als signifikant bezeichnet, wenn seine Existenzprüfung unter Berücksichtigung von Streuungen und Beobachtungsanzahl keine höhere Irrtumswahrscheinlichkeit als p = 0.05 zuläßt.

Die Strenge der Abhängigkeit zweier Beobachtungsgrößen ist durch den Koeffizient r_{xy} als statistische Maßzahl der Korrelation gekennzeichnet. Ob das empirisch beobachtete Maß an Abhängigkeit, (ideale Unabhängigkeit) $0 \leqslant r_{xy} \leqslant 1$ (ideale Abhängigkeit), mit genügend kleiner Irrtumswahrscheinlichkeit p ($p \leqslant 0.05$) bestimmt ist, ist mittels einer Prüfgröße $F_{emp.}$ zu testen. Die Existenz der Korrelation ist notwendige, jedoch nicht hinreichende Bedingung, um auf eine kausale Abhängigkeit zwischen den Beobachtungsgrößen zu schließen. Sie ermöglicht jedoch die Betrachtung ihrer Regression. Der Regressionskoeffizient b_x ist Maß für die mittlere

Veränderung der Meßgröße X bezüglich der Änderung der Größe Y um eine Einheit. Er bestimmt als Tangensfunktion der Meßgröße X die Neigung alpha der Regressionsgeraden Y gegen die Koordinatenachse der Größe X (tan(alpha) = y).

Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen - Analyse und Interpretation der Testergebnisse

1. Die Grenzen der Verdünnungsreihen sind für Normalgut und pathologische Verhältnisse entsprechend den Latexwerten von verschiedener Schwere wie folgt anzugeben:

Tabelle 1: Mittlere Grenzen $\bar{x}$ der Verdünnungsreihen mit ihren Standardabweichungen $\pm s_{\bar{x}}$ für beobachtete α_{2M} und β_{2M}-Globuline bei Normalseren und Seren mit verschiedenen Latexwerten.

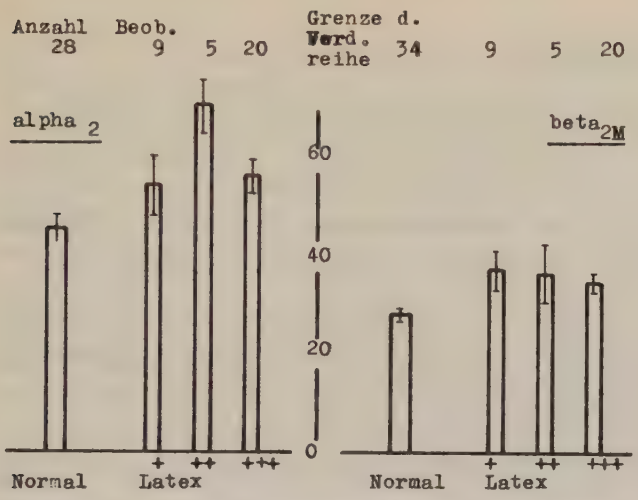
		α_{2M}	β_{2M}
	Anzahl d. Beob. n	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
Latex ∅	2/1	54/60	36
Latex +	9	54.9 ± 6.3	37.9 ± 3.8
Latex ++	5	71.2 ± 5.6	37.0 ± 6.1
Latex +++	20	56.7 ± 3.4	35.1 ± 2.2
Normalseren	28/34	45.8 ± 2.9	28.9 ± 1.4
95 % Vertrauensbereiche:		39.9 bis 51.7	26.1 bis 31.7

2. Die beobachteten Werte pathologischer Verhältnisse sind gegenüber den beobachteten Normalwerten in ihrem Mittel erhöht. Die einzelnen Stichproben (Latexwerte ∅ bis +++) lassen wegen der geringen Umfänge keinen direkten Zusammenhang zwischen der jeweiligen Anzahl Werte über dem 95%-Vertrauensbereich der Normalseren ablesen; jedoch sind für sie insgesamt mit 64% für alpha$_2$- und 60% für beta$_{2M}$-Globuline (bei 36 und 35 experimentellen Beobachtungen) nahezu gleiche Anteile der Anzahl überhöhter Werte festzustellen. Quantitativ lassen sich die beobachteten Unterschiede zusätzlich wie folgt sichern:

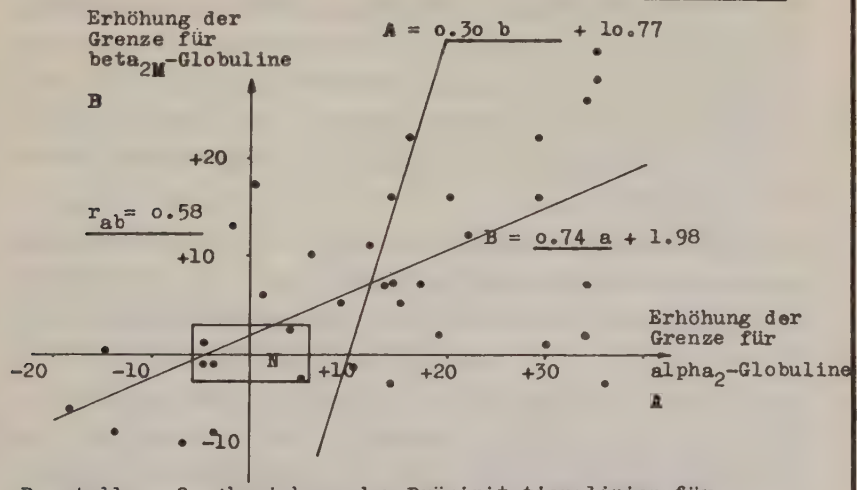
Tabelle 2: Die Überhöhung der Verdünnungsgrenze bei verschiedenen polyarthritischen Schweregraden gegenüber normalen Verhältnissen.

	Anzahl Werte über normalem 95% Vertrauensbereich (von Beob. insgesamt)	Erhöhung (total) gegenüber dem beobachteten Normalmittel abs. (m%)	Irrtumswahrsch. p	Signifikanzentscheidg.
$alpha_{2M}$				
Latex Ø	2 (2)	-	-	-
Latex +	5 (9)	9.1 (20%)	> 0.05	nicht sign.
Latex ++	5 (5)	25.4 (55%)	< 0.01	Erh. sign.
Latex +++	11 (20)	10.9 (24%)	< 0.05	Erh.sign.
insgesamt	23 (36)			
$beta_{2M}$				
Latex Ø	1 (1)	-	-	-
Latex +	6 (9)	9.0 (31%)	< 0.05	Erh. sign.
Latex ++	2 (5)	8.1 (28%)	> 0.05	nicht sign.
Latex +++	12 (20)	6.0 (21%)	< 0.05	Erh. sign.
insgesamt	21 (35)			

3. Die Prüfung der Korrelation von Latexwert als Kriterium für das Krankheitsstadium und -stand der Präzipitationslinie verwirft die Hypothese der Abhängigkeit. Vorausgesetzt, daß der Latexwert tatsächlich relevant ist für die Schwere der Krankheit, muß sein kausaler Zusammenhang mit den $alpha_2$- und $beta_{2M}$-Globulinen abgelehnt werden, obgleich die experimentellen Beobachtungen auf einen engen Zusammenhang zwischen den Erhöhungen der Verdünnungsgrenzen für $alpha_2$- und $beta_{2M}$-Globuline ($r_{xy} = 0.58$ mit $p < 0.001$) gegenüber normalen Verhältnissen hinweisen. Die Regressionskoeffizienten beschreiben dabei die Erhöhung für $alpha_2$-Globulin als doppelt so stark wie für $beta_{2M}$-Globulin des gleichen Serums ($b_{alpha_2} = 0.74$; $b_{beta_{2M}} = 0.30$).



Darstellung 1. Beobachtete mittlere Grenzen der Verdünnungsreihen mit ihren Standardabweichungen für alpha$_2$- und beta-$_{2M}$ Globuline bei Seren Gesunder und Polyarthritiker.



Darstellung 2. Abweichung der Präzipitationslinien für alpha$_2$-und beta$_{2M}$- Globuline bei Seren von 35 Polyarthritikern, bezogen auf den 95 %-Vertrauensbereich N für das Mittel (Koordinatenursprung) eines normalen Vergleichsgutes gesunder Probanden.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Serologie besitzt für die gesamte Rheumatologie zweifelsfrei eine ganz besonders wichtige Aussagekraft. Wenn sich auch in diesem diffizilen Gebiet die Befunde der einzelnen Untersucher nicht immer decken, ja sogar erheblich differieren oder sich widersprechen, so gibt es doch verschiedene Ergebnisse, die vielleicht in unterschiedlicher Weise bewertet, aber als Tatsache nicht mehr in Zweifel gezogen werden.

Dazu gehört der Rheumafaktor, der in seiner Bedeutung als für die primär chronische Polyarthritis charakteristisch, oder nur für die Differentialdiagnose und Abgrenzung der zum Teil in Übergängen fließenden Krankheitsbilder des rheumatischen Formenkreises unterschiedlich eingeschätzt wird. Jedenfalls ist er heterologer Natur (61), ein zusammengesetztes Globulin, an dem in erheblichem Maße die β_{2M}-Fraktion beteiligt ist.

Mathies (56) schlägt deswegen vor, statt wie bisher vom Rheumafaktor, lieber von Rheumafaktoren zu sprechen. Es läßt sich ebenfalls nicht klären, ob der Rheumafaktor ein abnormes Protein darstellt oder ob es sich, wie Svartz (94) meint, um einen Autoantikörper handelt, der normalerweise dem β_{2M}-Komplex angehört, oder nach Miehlke (57) um eine Veränderung der Struktur des Gewebseiweißes, die als Autoantigene wirken, wogegen wiederum der Gewebsautoantikörper gebildet wird. Beide Möglichkeiten sind denkbar, wobei die Antigene, die diese allergische Reaktion des Körpers auslösen, verschiedener Art sein und verschieden konfigurierte Gruppen besitzen können (30,58).

Unterschiedliche Ausfälle des Latexfixationstestes, die auch bei hoher Makroglobulinkonzentration den Test negativ erscheinen lassen, können, wie Svartz auf dem V. Kongress für Rheumatologie in Stockholm 1963 erwog, durch gewisse Änderungen der Molekularstruktur bedingt sein, also andere Vorgänge die Nachweismethoden beeinflussen, die dann einen andersartigen Ausfall vortäuschen, ähnlich wie auch Bakterienenzyme, z.B. Streptokokken einen positiven Hammelbluterythrozytentest vorspiegeln können (61,79). Bei der von Seifert (79) angegebenen Zusammensetzung aus einem Hämagglutinationsfaktor, zwei Latexpartikelagglutinations- und einem Streptokokkenagglutinationsfaktoren erscheint es durchaus vorstellbar, daß kleine Veränderungen in diesem komplizierten Gefüge andersartige Ausfälle bewirken können.

Der F II a Test nach Epstein scheint, wie Winblad (79) auf dem gleichen Kongreß angibt, die empfindlichste Nachweisreaktion des Rheumafaktors zu sein, sie ist aber dafür mit einer erheblich größeren Menge von fälschlich positiven Ausfällen bei Gesunden belastet.

Es ist weiterhin denkbar, daß die ausscherenden Ergebnisse unserer Versuchsreihe auch durch derartige Faktoren zu erklären sind, die den Ausfall der Reaktionen verzerren, ohne mit ihnen im Zusammenhang zu stehen; denn daß der Rheumafaktor eine enge Beziehung zur β_{2M}-Fraktion besitzt, die ihn vielleicht sogar zum Teil enthält, erscheint nach den in der Literatur angegebenen Ergebnissen gesichert. Cleve und Hartmann (19) finden im Vergleich zwischen Rheumatiker- und Normalseren einen erheblichen Unterschied gerade in der β/γ Fraktion, wobei die langsamer wandernde β_2-Fraktion in der immunelektrophoretischen Untersuchung in 4 von 6 untersuchten Fällen bei Rheumatikern vermehrt ist, ferner in 3 von 6 Fällen neben der normalen Gammafraktion eine zweite, mit ähnlicher elektrophoretischer Beweglichkeit zu finden ist, die im Normalserum nicht vorkommt. Versucht man die vorliegende β_{2M}-Vermehrung zum Teil als Begleiterscheinung der bei der primär chronischen Polyarthritis stets vorhandenen Entzündung zu erklären, so wird sie auch an Hand der von uns mit der Ouchterlony-Methode untersuchten Rheumatikerseren bestätigt. Scheiffarth (86) schlägt in seinen immunelektrophoretischen Studien schon vor, die β_{2M}-Globuline den Gammaglobulinen zuzurechnen. Damit würde der Stellung der primär chronischen Polyarthritis, die mit einer α_2- und β_{2M}-Vermehrung als Zeichen der akuten und chronischen Entzündung einhergeht, Rechnung getragen. Wir meinen gerade durch dieses, sehr exakte Untersuchungsverfahren, das, wie wir wissen, auch dort noch einen Nachweis durch die Präzipitation erlaubt, wo sonst die zu untersuchenden Mengen schon zu klein sind (64), recht zuverlässige Werte erhalten zu haben.

Bei der von uns benutzten Methode bilden sich die Präzipitationslinien auch bei sehr großen Verdünnungen noch aus, lassen sich aber häufig schwer ablesen, weil durch das Entfärben natürlich auch die schwächer ausgeprägten Linien ihre Tönung verlieren. Es besteht also theoretisch die Möglichkeit, daß der gefundene Wert nicht exakt ist, weil das Auge bei der makroskopischen Ablesung eine der zarten Linien, die die letzte Präzipitation und damit den Grenzwert darstellt, übersieht.

Wir sicherten uns in unserem Versuchsaufbau dadurch ab, daß wir uns in die Grenze gewissermaßen einschlichen, indem das Auge die Präzipitationslinie, die bei geringerer Verdünnung besser sichtbar war, verfolgt und so aus dem Vergleich mit dieser heraus, die Grenze zuverlässiger fand, zumal die Verdünnung stets erheblich über den erwarteten Wert hinaus fortgesetzt war. Der auftretende Fehler kann also im ungünstigsten Fall "einen Schritt" betragen, der bei einer Verdünnung von 1:11, 1:12 usw. statistisch sehr gering zu veranschlagen ist, zumal nach den langdauernden Vorversuchen eine gewisse Routine das Auftreten von Artefakten gering bleiben ließ. Wir glauben, durch das Belassen der Präparate für 72 Stunden im Brutschrank, die Ausbildung auch der schwächsten Linie ermöglicht zu haben. Andere Untersucher, die die Ouchterlony-Methode anwendeten, z.B. Hennisch (39) begnügten sich mit 24 - 36 Stunden. Ouchterlony gibt in seiner ersten Arbeit (64) an, daß nach 2 Tagen gut ausgebildete Präzipitationslinien auftreten, die bis zum 6. Tage so bleiben.

Rickels (80) prüft in seiner Arbeit über die Empfindlichkeit von Keimen die Frage, ob der Reihenverdünnungstest oder der Agarloch-Test genauere Ergebnisse liefert und ist entgegen der Ansicht einiger anderer Autoren selber der Meinung, daß bei sorgfältiger Technik und genauer Auswertung der Lochtest dem Reihenverdünnungstest nicht nachsteht.

Die von ihm erwähnte, im Routinebetrieb gegebene Gefahr, mit verschmutzten Pipetten zu arbeiten, entgingen wir, indem wir zur Füllung unserer Versuchsansätze bei jeder erneuten Verdünnung eine unbenutzte, selbstgezogene Mikropipette nahmen, die nach einmaligem Gebrauch verworfen wurde.

Die Normalseren, die wir von der Bayerischen Blutbank in München erhielten, weisen an Hand unserer Tabelle gewisse Schwankungen auf. Wir nehmen dafür drei Gründe an:
Erst einmal finden wir, wie bei jeder biologischen Untersuchung, ein gewisses Pendeln der Ergebnisse um einen Durchschnittswert. Daneben besteht die Möglichkeit, daß unter den Normalseren, die von Blutspendern, also weitgehend gesunden Personen stammen, sich einige befinden, die aus irgendwelchen Gründen eine α_2- und β_{2M}-Globulin-Vermehrung haben, die bei der routinemäßigen Vorprüfung auf

WaR, durchgemachte Hepatitis etc. nicht erfaßt wurde. Der dritte Grund für den, gerade in unserer Tabelle sichtbaren Sprung zwischen den in unserem Versuch mit N und H verzeichneten Seren, ist mit dadurch zu erklären, daß sie aus zwei verschiedenen Reihen stammen, wo bei der einen möglicherweise durch wiederholtes Auftauen Eiweißveränderungen eingetreten waren, die bei der anderen, frisch gewonnenen und benutzten, fehlten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Untersuchung einer angemessenen Zahl von Rheumatikerseren bei unterschiedlichem Latexwert mit Hilfe der Ouchterlony-Methode und der Vergleich mit Normalseren zwar in vielen Fällen eine deutliche Zunahme der β_2- wie der α_2-Makroglobuline ergab.

Es kann aber daraus nicht auf eine Parallelität zwischen dem Anstieg der β_2-Makroglobuline bei Rheumatikern und einer Verstärkung in der Aktivität des Rheumafaktors geschlossen werden. Vielmehr ist die Vermehrung der α_2- und β_2-Makroglobuline unabhängig von dieser, erhielten wir doch, wie unsere Tabellen zeigen, in verschiedenen Fällen bei unseren Versuchen auch eine β_2-Makroglobulinvermehrung bei negativem Latex, ebenso wie wir durch die Untersuchung der Normalseren Ergebnisse fanden, die über dem Mittelwert lagen.

Die Untersuchungen mit der durch die Ouchterlony-Methode gegebenen Möglichkeiten und die umfangreichen Verdünnungsreihen zeigten zwar, daß der Rheumafaktor wohl im Bereich der β_2-Makroglobuline lokalisiert ist, seine Aktivität aber wohl unabhängig von einer Zunahme der α_2- oder β_2-Makroglobuline ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden in Anlehnung an die Ouchterlony-Methode 34 Normalseren und 36 Seren von Polyarthritis-Patienten mit unterschiedlichem Schweregrad aus der Rheumaambulanz der Universitäts-Poliklinik München daraufhin geprüft, ob eine Abhängigkeit zwischen dem Anstieg der α_2- und β_2-Makroglobuline und der Zunahme des Rheumafaktors besteht.

Die Versuche waren so angelegt, daß der Umfang des untersuchten Bereiches auch noch weit ausscherende Ergebnisse erfaßte, daneben die arithmetische Verdünnungsreihe mit ihren kleinen Schritten der angewandten Mikromethode Rechnung trug. Die Ergebnisse wurden darüber hinaus durch eine mathematische Statistik ausgewertet.

Die Beobachtungen von Präzipitationslinien für α_2- und β_2-Makroglobuline lassen auf Unterschiede zwischen den Werten normaler und pathologischer Verhältnisse schließen. Für beide Globulintypen liegen mit rund 2/3 der beobachteten Werte von Patientenseren mit verschiedenen Latexwerten gleich viele über dem 95%-Vertrauensbereich des erwarteten Mittels für Normalseren.

Die Hypothese eines unmittelbaren Zusammenhanges oder gar Parallelität zwischen Verdünnungsgrenzen und Latexwerten muß nach vorliegenden Versuchsreihen jedoch abgelehnt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ABC des Rheumatismus, Konstanz, Byk-Gulden-Lomberg (1963)
2. AMBROSE, E.J., EASTY, G.C. Nature 172,811 (1953)
3. ANTWEILER, H.J. Die quantitative Elektrophorese in der Medizin, Berlin 1957
4. ARMSTRONG, S.H., BUDKA, M.E.J., MORRISON, K.C. J.Amer.Chem.Soc. 69,916 (1947)
5. AUGUSTIN, R. Int.Arch.ofAllergy 11,218 (1957)
6. ÄRZTLICHE PRAXIS IM BILD 3 Cadmiumsulfatreaktion
7. ÄRZTLICHE PRAXIS IM BILD 45 Immunelektrophorese
8. ÄRZTLICHE PRAXIS IM BILD 70 Takata Reaktion
9. BARTFELD, H. J.of Lab.Medicine 56,303 (1960)
10. BECHHOLD, H. Z.f.Physikalische Chemie 52,185 (1905)
11. BECHHOLD, H., ZIEGLER, J. Z.f.Physikalische Chemie 56,105 (1906)
12. BECKER, E.L. Fed.Proceedings 12,717 (1953)
13. BEHREND, T. u.CLEVE, H. Z.f.Rheumaforsch. 19,121 (1960)
14. BJÖRKLUND, B. Int.Arch.of Allergy 5,293 (1954)
15. BJÖRKLUND, B. u.BERENGO, A. Acta path. et microb.scand. 34,79 (1954)
16. BRITTINGER, G. u.NASS, G. Umschau 61,599 (1961) zit.nach Mat.Medica XIV 5 1962
17. CHRIST Ärztl.Praxis 14,1879 (1962)
18. CLEVE, H. u.HARTMANN, F. Klin.Wschr. 35,334 (1957)
19. CLEVE, H. u.HARTMANN, F. Verh.d.Dtsch.Ges.f.Innere Med. 63,637 (1957)
20. CLEVE, H. u.HARTMANN, F. Päd.Praxis 1,67 (1962)
21. CONSCIENTIA DIAGNOSTICA 2 Rheuma-Serodiagnostik, Byk-Gulden-Lomberg, Konstanz (1964)
22. DAHL, M. Kinderärztl.Praxis 7,289 (1960)
23. DEICHER, H. Klin.Wschr. 39,612 (1961)
24. DOLE, V.P. J.Clin.Invest. 23,708 (1944)
25. ELEKTROPHORESE-VORDRUCK der Poliklinik München
26. FEINBERG, J. Int.Arch.of Allergy 11,129 (1957)
27. FEINBERG, J. Int.Arch.of Allergy 16,1 (1960)

28. FEUERSTEIN, G. Monatskurse f. Ärztl. Fortbild. 8,481 (1961)

29. FRICKE, R. Z. f. Rheumaforsch. 20,285 (1961)

30. GRABAR, P. Behringwerke Mitt. 35,19 (1958)

31. GÜNTHER, R. Z. f. Rheumaforsch. 18,299 (1959)

32. HALL, A. P., MEDNIS, A. D. u. BAYLES J. Med. 258,731 (1958)

33. HARTER, F. Z. f. Rheumaforsch. 18,150 (1959)

34. HARTER, F. Ärztl. Mitt. 48,2503 (1962)

35. HARTMANN, F. u. SCHLEGEL, B. Klinik d. Gegenw. 8,350 (1959) zit. nach Homburg Akzente 3,8 (1960)

36. HAYWARD, B. J. u. AUGUSTIN, R. Int. Arch. of Allergy 11,192 (1957)

37. HEILMEYER, L. Lehrbuch der Inneren Medizin II. Aufl. (1961)

38. HENNING, N. Klinische Laboratoriumsdiagnostik II. Aufl. (1960)

39. HENNISCH, M. P. Int. Arch. of Allergy 16,153 (1960)

40. HEUBERGER, W. Z. f. Rheumaforsch. 19,116 (1960)

41. HITTMAIER, A. u. GÜNTHER, R. Z. f. Rheumaforsch. 19,46 (1960)

42. HUSSELS, H. Zbl. f. Bakteriol. 162,67 (1955)

43. IMRE, I. u. CINTAN, M. Z. f. Rheumaforsch. 19,345 (1960)

44. IMRE, I. V. Europäischer Rheumakongress Stockholm (1963)

45. ISLIKER, H. u. KLUTHE, R. Verh. d. Dtsch. Ges. f. Innere Med. 66. Kongr. 630 (1960)

46. KAMINSKI, M. J. of Immunology 75,367 (1955)

47. KAMINSKY, M., OUCHTERLONY, Ö. Bull. Soc. Chim. Biol. 33,758 (1951)

48. KANZOW, U. Päd. Praxis 2,541 (1963)

49. KOVACS, L. Z. f. Rheumaforsch. 18,292 (1959)

50. KUKOWKA, A. Z. f. Rheumaforsch. 14,24 (1955)

51. KUNKEL, H. G. u. FUDENBERG, H. H. X. Internat. Liga z. Bekämpfg. d. Rheum. Rom 1961 zit. nach 1

52. LABORATORIUMSDIAGNOSTIK DER LEBERERKRANKUNGEN Thomae, Biberach

53. LEIPERT, Th. 12. Dtsch. Kongr. f. Ärztl. Fortbild., Berlin (1963) zit. nach Selecta 24,742

54. MARKOWITZ, M.	J.Clin.Invest. 42,409 (1963)
55. MATHIES, H.	Med.Klin. 45,2028 (1960)
56. MATHIES, H.	Untersuchungen zur Natur u.Reaktionsweise des Rheumafaktors und der Inhibitoren. Habil. MU. 1964
57. MIEHLKE, K. u. PUTTNIS, T.	Z.f.Rheumaforsch. 18,372 (1959)
58. MIESCHER, P.u.VORLAENDER, K.O.	Die Immunpathologie in Klinik u.Forschung u.d.Problem d.Antikörper, Thiemeverl.(1957)
59. MÜLLER-EBERHARD, H.J., KUNKEL, H.G., FRANKLIN, E.C.	Verh.Dtsch.Ges.f.Innere Med. 63,642 (1957)
60. MÜLLER, W.	Z.f.Rheumaforsch. 15,31 (1956)
61. MÜLLER, W. u.SCHUPP, E.	Z.f.Rheumaforsch. 18,97 (1959)
62. MÜLLER, W. u.SCHUPP, E.	Z.f.Rheumaforsch. 18,378 (1959)
63. MÜLLER-SEIFERT-v.KRESS	Taschenb.d.Med.Klin.Diagn. 68.Aufl.(1962)
64. OUCHTERLONY, Ö.	Arkiv f.kemi, 26 B, No.14 (1948)
65. OUCHTERLONY, Ö.	Acta path.et microb.Scand. 25,186 (1948)
66. OUCHTERLONY, Ö.	Acta path.et microb.Scand. 26,516 (1949)
67. OUCHTERLONY, Ö.	Lancet 2,346 (1949)
68. OUCHTERLONY, Ö.	Acta pathol.et microb.Scand. 26,507 (1949)
69. OUCHTERLONY, Ö.	Arkiv f.kemi, 1,43 (1949)
70. OUCHTERLONY, Ö.	Arkiv f.kemi 1,55 (1949)
71. OUCHTERLONY, Ö., ERICSSON u.NEUMÜLLER	Acta Med.Scand. 138,76 (1950)
72. OUCHTERLONY, Ö.	C.R.VI.Congr.Int.Microb. Rome 1953 2,276 (1953)
73. OUCHTERLONY, Ö.	Progress in Allergy 5,1 (1958)
74. OUCHTERLONY, Ö.	Progress in Allergy 6,30 (1962)
75. OUCHTERLONY, Ö.	Acta dermat.et venerol.Proc. 11th Internat. Congr. Dermat. 1957, Vol. 3,564 (1957)
76. OUCHTERLONY, Ö.	Recent Progress in Microbiology Symposia held at the VII.Internat.Congr.f.Microbiol. Stockholm 163 (1959)
77. PLASMAPROTEIN-ANTISEREN	Behringwerke f.d.immunol.Bestimmung v. Plasmaproteinen
78. REPLOH-OTTO	Lehrbuch d.Mediz.Mikrob.u.Infektionskrankh. (1961)

79. RHEUMATOLOGIE HEUTE — Doc.Geigy, 5.Europ.Rheumakongr. Stockholm 1963

80. RICKELS, K. — Zbl.f.Bakteriol. 162,112 (1955)

81. ROSE, M., BAGAN, C., PEARCE, E. — Proc.Soc. Exper.Biol.Med. 68,1 (1948)

82. ROSS, J.u.VORLAENDER, K.O. — Int.Arch.of Allergy 17,86 (1960)

83. SCHEIFFARTH, F., GÖTZ, H., SOERGEL — Int.Arch.of Allergy 10,82 (1957)

84. SCHEIFFARTH, F.u.BERG, G., GÖTZ, H., TRABULSI, L.R. — Int.Arch.of Allergy 10,276 (1957)

85. SCHEIFFARTH, F., BERG, G., SCHULER et al. — Int.Arch.of Allergy 11,246 (1957)

86. SCHEIFFARTH, F.u.GÖTZ, H. — Int.Arch.of Allergy 16,61 (1959)

87. SCHETTLER, G. — Med.Mschr. 5,622 (1951)

88. SCHIØTT, C.R. — Acta path.et microbiol.scand. 32,251 (1953)

89. SCHULER, B. — Methods of Informat.in Med. 2,129 (1963)

90. SCHULTZE, H.E.u.SCHWICK, G. — Behringwerke Mitt. 35,57 (1958)

91. SCHWARZ, G. — Das C-reaktive Protein, Steinkopffverlag, Darmstadt (1963)

92. STAHL, R. — Der prakt.Arzt u.Medizin heute 470, Nov. (1961)

93. STANWORTH, R. — Int.Arch.of Allergy 11,171 (1957)

94. SVARTZ, N. — Acta med.scand. 139,18 (1951) zit.nach 1

95. STEINBROCKER — Z.f.Rheumaforsch. 17,350 (1958)

96. TAUBE — Z.f.Rheumaforsch. 18,187 (1959)

97. TAUBNER, A., KLEIN, G., LINDNER, H. — Ärztl.Mitt. 36,1809 (1962)

98. TISELIUS, A. — Medizinisches Prisma 5, Elektrophorese (1962

99. VAUGHAN, J.H.u.BUTLER, V.P.jr. — Ann.Int.Med. 56,1 (1962)

100. VAUGHAN, J.H. — J.of Immunol. 77,181 (1956)

101. WAALER, E. — Acta path.et microb.scand. 17,172 (1940)

102. WEISE, H.J. — Fortschr.d.Med. 22,853 (1963)

103. WIEDERMANN, G. — Zbl.f.Bakt. 187,278 (1962) zit.nach Ärztl. Mitt. 34,1680 (1963)

104. WILSON, M.W.u.PRINGLE, B.H. — J.of Immunol. 75,460 (1955)

105. WILSON, M.W.u.PRINGLE, B.H. — J.of Immunol. 77,324 (1956)

106. WISSENSCHAFTLICHE TABELLEN — Geigy Basel (1953)

107. WODEHOUSE, R. Int. Arch. of Allergy 5, 337 (1954)

108. WÖHLER, F., MÜLLER, W., HOFFMANN, A. Z. f. Rheumaforsch. 19, 85 (1960)

109. WUNDERLY Die Papierelektrophorese, Aarau, H. R. Sauerländer (1954)

110. ZIFF, M. Ann. J. Med. 20, 500 (1960)

111. ZUR DIAGNOSE DES RHEUMATISMUS II Byk-Gulden-Lomberg, Konstanz

LEBENSLAUF

Am 26.X.1936 wurde ich als Sohn des Juristen Ernst Baron v.Mirbach und seiner Frau Erica geb. v. Gernet in Riga geboren.

Durch die Umsiedlung der deutschen Volksgruppe aus dem Baltikum kam ich 1939 nach Posen. Mein Vater wurde 1942, nach der Befreiung Rigas, dorthin als Stadtrat berufen, und wir konnten ihm für zwei Jahre folgen.

Hier wurde ich im Herbst 1942 eingeschult. Durch die Frontnähe gezwungen, zogen wir im Sommer 1944 in unsere Posener Wohnung zurück, ehe wir ein halbes Jahr später von dort weiter nach Birkenwerder bei Berlin flüchten mußten. Im Frühjahr 1947 wurde mein Vater von der sowjetischen Besatzungsmacht verhaftet, und wir flohen nach seiner Freilassung auf das Gut Hemmelmark bei Eckernförde in Schleswig-Holstein. Ich besuchte von 1947 bis 1952 die Oberschule in Eckernförde, trat dann für drei Jahre in das Carl-Hunnius-Internat in Wyk auf Föhr ein und machte im Frühjahr 1957 mein Abitur am Ulricianum in Aurich/Ostfriesland. Anschließend arbeitete ich 9 Monate als Werkstudent im Internat in Wyk auf Föhr und begann dann mit meinem Medizinstudium in Göttingen, wechselte nach meinem Vorphysikum nach München und für 2 Semester nach Erlangen, wo ich im Sommer 1961 mein Physikum bestand.

Die folgenden 6 klinischen Semester über studierte ich in München und legte im Februar 1965 mein Staatsexamen ab.

Herrn Professor Dr. W. Seitz danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. H. Mathies bin ich für das Interesse, das er dieser Arbeit entgegen brachte, sowie für viele wertvolle Hinweise, sehr dankbar, ebenso wie ich Herrn Dr. I. Imre für die Anleitung beim Versuchsaufbau und beim Anfertigen der Präparate zu großem Dank verpflichtet bin.

Herr W.I. Ziegler in Zürich besorgte dankenswerter Weise die statistische Berechnung.

Die Schwierigkeit, in den Präparaten, die nur schwach erkennbaren Linien doch noch auf der photographischen Platte darzustellen, gelang in bestmöglicher Form der photographischen Anstalt Schwarz in München.